



**Rui Jorge Alves Rocha Toxicidade de drogas anticolinesterásicas  
terapêuticas em *D. magna***



**Rui Jorge Alves Rocha Toxicidade de drogas anticolinesterásicas  
terapêuticas em *D. magna***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada – ramo Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Bruno Nunes (Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa), da Doutora Catarina Marques (Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro) e do Prof. Doutor Fernando Gonçalves (Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro).



Ao meu Avô Vital



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor António José Arsénia Nogueira**

Professor Associado c/ Agregação, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

**Doutor Bruno Branco Castro**

Investigador Auxiliar, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes**

Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa

**Doutora Catarina Pires Ribeiro Ramos Marques**

Investigadora de Pós-Doutoramento, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves**

Professor Associado c/ Agregação, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro



## agradecimentos

Neste espaço gostaria de destacar, não necessariamente por alguma ordem em especial, várias pessoas que de alguma forma me ajudaram a conseguir chegar até aqui e concluir mais uma etapa na minha formação académica e pessoal.

Gostaria de começar por agradecer em primeiro lugar à minha família, nomeadamente os meus pais por todo o esforço, dedicação e sacrifícios que tiveram que fazer para me conseguirem pôr a estudar durante todo este tempo.

Gostaria também de agradecer a todos os meus amigos da Cooperativa, ao Vasco, ao Gonçalo, ao Alberto, ao Tiago, ao Nuno, ao Leandro, entre outros, que todos os dias desde os tempos de primária em que nos conhecemos (alguns mesmo antes), os grandes amigos que são e todo o tempo que passamos sempre com algo para fazer, projectos, as tardes infindáveis de futebol, de monopólio, as noites sempre passadas em conversas animadas e divertidas, as idas ao piolho o antigo ponto de encontro entre tantas outras coisas que ficam por dizer...

Gostaria também de agradecer às pessoas que conheci nos tempos ciclo e de secundário, das quais muitos bons momentos passei e que ficaram grandes amigos, queria destacar no entanto o Luís, a Vânia, a Miranda, a Sara, o Juliano, o Joaquim, a Marlene todo o carinho e amizade e os bons momentos passados, as tardes de cartas dominó e uno...

Queria agradecer às pessoas que conheci aquando da minha passagem pela *mui nobre* Universidade do Minho, de uma maneira muito especial à Irmandade do Chamade e de uma maneira geral à parte de trás do apelidado bloco de esquerda. Nomeadamente o Sr. Dr. Prés. Sérgio, e os membros Luís, Nuno, Jorge Paulo, Bruno, Hugo, Ferreira, Leonel e o membro honorário Pedro (Carreira), por todos os momentos e todas as peripécias pelas quais passamos. Queria salientar no entanto o meu apreço e agradecimento ao Nuno e ao Jorge Paulo, pela forma como juntos conseguimos, ou estamos em vias de, ultrapassar todas as peripécias (é Aveiro, vá...) que esta passagem nos trouxe.

Queria também agradecer à Ana todo o apoio, carinho e amizade que me deu nestes últimos meses, que foram muito importantes para mim.

Por fim, no entanto, não menos importante a todos os LEADER's o apoio, a preocupação, a disponibilidade que sempre tiveram comigo no sentido de auxiliar no desenvolvimento do meu trabalho tornando possível a sua execução e conclusão. Dentro deste grupo gostaria de salientar o trabalho, interesse e preocupação dos meus orientadores, o Prof. Doutor Bruno Nunes e da Doutora Catarina Marques, assim como do Prof. Doutor Fernando Gonçalves.

A todas as pessoas que contribuíram para aquilo que sei e que sou um sincero obrigado.





## palavras-chave

neostigmina, piridostigmina, *Daphnia magna*, ensaios agudos, inibição colinesterásica, taxa de filtração, taxa de ingestão, ensaios crónicos, ecotoxicidade de fármacos.

## resumo

Este estudo consistiu no estudo dos efeitos toxicológicos de dois fármacos, a neostigmina e a piridostigmina, que têm como efeito terapêutico uma inibição reversível da actividade da acetilcolinesterase, sendo utilizados no tratamento de uma patologia humana, a Miastenia grave. Sendo a função da transmissão nervosa relativamente conservada em organismos vertebrados e invertebrados, a exposição a estes compostos poderá causar efeitos em organismos não alvo, caso atinjam os ecossistemas aquáticos. De forma a avaliar este risco potencial, foram estudadas as respostas agudas (imobilização e comportamento alimentar) e crónicas (reprodução e crescimento) de *Daphnia magna* exposta a diferentes concentrações destes dois compostos. Com este trabalho foi possível obter valores de  $EC_{50} - 48\text{ h}$  (ensaio de imobilização) de  $167,7\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e  $91,3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para a piridostigmina. No ensaio de actividade colinesterásica foi determinado um  $IC_{50} - 48\text{ h}$  de  $2,62$  e  $4,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e piridostigmina, respectivamente. Ao nível do comportamento alimentar, os  $EC_{50} - 5\text{ h}$  obtidos para as taxas de filtração foram de  $7,1$  e  $< 1,45\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , para a neostigmina e piridostigmina, respectivamente; para as taxas de ingestão foram respectivamente  $7,5$  e  $< 1,45\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . Relativamente aos ensaios crónicos de avaliação de efeitos ao nível da reprodução obteve-se um LOEC de  $41,93\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  e de  $11,40\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e piridostigmina, respectivamente; ao nível da taxa intrínseca de crescimento e do tamanho dos neonatos da primeira ninhada obteve-se um LOEC de  $41,93\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina. Por fim, o crescimento somático revelou ser o parâmetro mais sensível nas exposições crónicas, obtendo-se LOECs de  $20,97\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,85\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e piridostigmina, respectivamente). Estes resultados demonstram que estes compostos são extremamente tóxicos em *D. magna*, a concentrações na ordem dos  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A comparação dos resultados obtidos com os níveis de concentração ambientais de piridostigmina sugerem um risco ao nível do comportamento alimentar de *D. magna*. No entanto deve-se ter em consideração que no ambiente estes compostos podem existir em associação com outros anticolinesterásicos podendo, apresentar efeitos tóxicos mais pronunciados.



## keywords

neostigmine, pyridostigmine, *Daphnia magna*, acute tests, cholinesterase inhibition, filtration rate, ingestion rate, chronic tests, ecotoxicity of pharmaceuticals.

## abstract

This study assessed the toxicological effects of two drugs, neostigmine and pyridostigmine, whose therapeutic effects consist on a reversible inhibition of acetylcholinesterase activity, and have thus been used to treat the human disease known as Myasthenia gravis. Being the function of the nervous transmission relatively conserved in vertebrate and invertebrate organisms, exposure to these compounds could exert noxious effects in non-target organisms, whenever these drugs are present in aquatic ecosystems. In order to assess this potential risk we studied the acute (immobilization and feeding behaviour) and chronic (growth and reproduction) responses of *Daphnia magna* exposed to different concentrations of the two compounds. With this work, it was possible to obtain 48 h EC<sub>50</sub> values (immobilization assay) 167.7  $\mu\text{g L}^{-1}$  for neostigmine and 91.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  for pyridostigmine. Regarding cholinesterase activity, we determined an IC<sub>50</sub> - 48 h of < 2.62 and 4.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  for neostigmine and pyridostigmine, respectively. In terms of feeding behavior, it was possible to calculate an EC<sub>50</sub> - 5 h for filtration rates of 7.1 and < 1.45  $\mu\text{L}$  for neostigmine and pyridostigmine, respectively; for the ingestion rates, these were respectively 7.5 and < 1.45  $\mu\text{g L}^{-1}$ . In order to evaluate effects on reproduction, chronic tests were performed and the LOEC concerning fecundity was 41.93  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 11.40  $\mu\text{g L}^{-1}$  for neostigmine and pyridostigmine, respectively; the intrinsic rate of increase and the size of the first brood were affected at a LOEC level of 41.93  $\mu\text{g L}^{-1}$  for neostigmine. Finally, the somatic growth rate was also impacted, and effects were observed at lower concentrations, with the LOECs being 20.97  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 2.85  $\mu\text{g L}^{-1}$  for neostigmine and pyridostigmine, respectively. These results demonstrate that these compounds are extremely toxic in *D. magna* at concentrations in the order of  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A comparison of the results obtained with actual concentration values of pyridostigmine can pose at risk the feeding behavior of *D. magna* populations. However, it should be considered that in the environment, these compounds are potentially associated with other anticholinesterase substances, thus potentially exerting more pronounced effects.



# Índice

Índice .....	I
Lista de Abreviaturas .....	III
1. Introdução.....	5
1.1. Fármacos no ambiente .....	5
1.1.1. Introdução.....	5
1.1.2. Fontes e destino .....	6
1.1.3. Relevância e perigos.....	10
1.1.4. Metabolismo.....	11
1.1.5. Legislação .....	12
1.1.6. Considerações finais .....	13
1.2. Fármacos em estudo .....	16
1.3. Miastenia grave.....	18
1.4. Organismo teste: <i>Daphnia magna</i> .....	18
1.4.1. Ecologia .....	18
1.4.2. Ciclo reprodutivo.....	19
1.4.3. Alimentação.....	21
1.4.4. Testes ecotoxicológicos .....	21
1.5. Objectivos.....	23
2. Material e métodos .....	25
2.1. Fármacos e concentrações testadas.....	25
2.2. Manutenção das culturas .....	25
2.3. Desenho experimental (testes com <i>D. magna</i> ) .....	26
2.3.1. Ensaaios agudos.....	26
2.3.2. Ensaaios crónicos .....	26
2.3.3. Ensaaios enzimáticos .....	28

2.3.4. Ensaio de comportamento alimentar.....	29
2.4. Análise estatística .....	30
3. Resultados e discussão.....	31
3.1. Aspectos gerais .....	31
3.2. Ensaio agudo.....	31
3.3. Ensaio enzimático .....	33
3.4. Ensaio de comportamento alimentar.....	35
3.5. Ensaio crónico .....	39
4. Considerações finais/conclusões.....	47
5. Bibliografia .....	51
6. Anexos .....	67

## Lista de abreviaturas

°C – Graus célsius

µg – Micrograma

µL – Microlitros

µS – Microsiemens

AChE – AcetilColinesterase

ANOVA - ANalysis Of Variance

ASTM – American Standards for Testing and Materials

ATP – Adenosine-5'-TriPhosphate

ChE – Colinesterase

cm – Centímetro

DNA – DeoxyriboNucleic Acid

DTNB – 5,5'-DiThiobis-(2-NitroBenzoic acid)

EC<sub>50</sub> – Effective Concentration (50%)

EMA – European Medicines Agency

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

EU TGD – European Chemicals Bureau Technical Guidance Document

FDA – Food and Drug Administration

g – Grama

h – Hora

IC<sub>50</sub> – Inhibition Concentration (50%)

IgG – Imunoglobulina G

L – Litro

LOEC - Lowest Observed Effect Concentration

M – Molar

MBL – Marine Biological Laboratory

mg – Miligrama



min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MXR – MultiXenobiotic Resistance

ng – Nanogramas

nm – Nanometros

nmol – Nanomole

NOEC - No Observed Effect Concentration

OCDE – Organização para a Cooperação Desenvolvimento e Economia

PChE – PseudoColinesterase

PEC – Predicted Environmental Concentration

PNEC – Predicted Non-Effect Concentration

rpm – Rotações por minuto

TCI – Taxa de Crescimento Intrínseca

UDP – Uridine 5'-diphospho

UV – Ultra Violeta

## 1. Introdução

### 1.1. Fármacos no ambiente

#### 1.1.1. Introdução

Actualmente e em resultado das actividades humanas, milhares de compostos (metais, fármacos, pesticidas, entre outros) são passíveis de serem libertados para o ambiente em resultado da sua utilização pelo Homem. Deste modo podem causar efeitos nocivos quer às populações humanas que directamente ou indirectamente com eles contactam, quer aos organismos que vivem nos ecossistemas onde diferentes compostos são libertados (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Weigel, 2003; Escher *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2008; Gunnarsson *et al.*, 2008; Fick *et al.*, 2010; Ginebreda *et al.*, 2010; Jelic *et al.*, 2011).

De entre essa variedade de compostos encontram-se os compostos com função terapêutica, genericamente denominados de fármacos. As drogas farmacológicas são substâncias usados no diagnóstico, tratamento (cura/atenuação de efeitos), alteração, prevenção de doenças, condição de saúde e/ou na melhoria da estrutura/função do corpo humano (Daughton e Ternes, 1999). Para além da sua aplicação na medicina humana, um grande número de compostos é também aplicado na medicina veterinária para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas no gado, por exemplo. Adicionalmente os antibióticos são usados na eliminação de organismos prejudiciais, favorecendo o crescimento de organismos benéficos na criação de gado (Weigel, 2003).

O desenvolvimento e aplicação de fármacos mudaram aparentemente as sociedades humanas no curso do último século. Com o melhoramento da nutrição, condições de trabalho e sanitárias, as substâncias farmacêuticas contribuíram para um aumento da esperança média de vida de mais de 20 anos, pelo menos nas sociedades ocidentais (Weigel, 2003). Com a excepção dos antibióticos e dos antineoplásicos, o objectivo da aplicação da maioria dos fármacos consiste no controlo de sintomas. Assim sendo, algumas drogas são consumidas durante muito tempo, por vezes durante uma grande parte do tempo de vida do paciente (Daughton e Ternes 1999), se este sofrer de uma doença crónica. De facto, estes

## 1. Introdução

compostos têm sido usados em quantidades significativas por todo o mundo e o seu consumo está a aumentar de forma consistente devido à descoberta de novas drogas, ao aumento populacional, à inversão da estrutura etária da população, à disponibilidade de genéricos que são menos dispendiosos (Daughton, 2003). Estima-se que desde o final do século XIX tenha havido um crescimento de vinte vezes no número de fármacos disponibilizados no mercado. Actualmente cerca de 3000 substâncias diferentes são usadas mundialmente (Daughton e Ternes, 1999; Ginebreda *et al.*, 2010). Estima-se que o consumo anual *per capita* de produtos farmacêuticos (princípio activo mais excipiente) seja na ordem dos 15 g, no entanto em países industrializados este valor ascende aos 50-150 g (López-Serna *et al.*, 2010). Por exemplo, as quantidades de analgésico iboprufero prescritas na Alemanha chegaram a um total de cerca de 150 toneladas em 2000 (Schwabe e Paffrath, 2001), não contando com as possíveis vendas deste fármaco sem prescrição. Relativamente ao caso português o consumo de substâncias farmacêuticas foi em 2009 de cerca de 137 471 454 embalagens, sendo que as três substâncias activas mais comercializadas em Portugal o paracetamol (3 642 302 embalagens), sinvastatina (2 941 467 embalagens) e metformina (2 429 287 embalagens) (Estatística do Medicamento, Infarmed, 2009). No entanto apenas uma pequena percentagem destes compostos ( $\approx 150$ ) foram investigados sob o ponto de vista da sua presença e consequências ambientais (Ginebreda *et al.*, 2010).

A ocorrência de fármacos no ambiente aquático é hoje em dia um facto adquirido (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Weigel, 2003; Escher *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2008; Gunnarsson *et al.*, 2008; Fick *et al.*, 2010; Ginebreda *et al.*, 2010; Jelic *et al.*, 2011) e tornou-se matéria de preocupação tanto a nível científico como social. Toneladas de diferentes classes de fármacos entram no ambiente por diferentes vias, depois do seu uso e excreção pelo Homem (Ginebreda *et al.*, 2010).

### 1.1.2. Fontes e destino

A possibilidade dos fármacos poderem entrar no ambiente e afectar o biota tem vindo a ser reforçado na literatura há várias décadas (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Weigel, 2003; Escher *et al.*, 2005; Barnes *et al.*,

## 1. Introdução

2008; Gunnarsson *et al.*, 2008; Fick *et al.*, 2010; Ginebreda *et al.*, 2010; Jelic *et al.*, 2011). No entanto os fármacos raramente foram vistos como potenciais poluentes ambientais e até aos anos 90 qualquer esforço na procura de compostos farmacológicos no ambiente teria um sucesso limitado, visto que as ferramentas para a sua detecção e de outras substâncias presentes naturalmente no ambiente (na ordem dos ng/L ou das partes por trilião) não eram eficientes. Outro obstáculo com que estes estudos se deparavam e ainda se deparam é que grande parte dos fármacos e seus metabolitos não se encontram nas bibliotecas de espectro de massa vocacionadas para este tipo de estudos (Daughton e Teres 1999). Actualmente pouco se sabe acerca dos efeitos que estes químicos e os seus metabolitos podem ter no biota quando expostos às baixas concentrações (ng-μg/L) em que ocorrem no ambiente (Daughton e Teres 1999).

A introdução de fármacos no ambiente, tal como se pode observar pela figura 1, pode ter várias origens. Uma das mais importantes está associada ao uso e rejeição domésticos, visto que uma grande parte da produção de fármacos se destina ao consumo humano (1a) ou à medicina veterinária (1b). Dentro desta área temos o caso dos animais que são abatidos e que por negligência são deixados ao ar livre, podendo servir de fonte de alimento para necrófagos e decompositores (1c). Após a sua ingestão e metabolização os fármacos e seus derivados são excretados maioritariamente pelas fezes e urina, mas também pode acontecer pelo suor e vómito. O destino final será consequentemente o sistema de saneamento quer seja ou não ligado às estações de tratamento de água municipalizadas. Aí caso haja danos nas tubagens estes compostos infiltrar-se-ão no solo e por escorrência poderão atingir os aquíferos (3a). Outra das fontes destes compostos no ambiente advém da sua libertação directa em cursos de água utilizados pelas populações humanas para higiene diária ou em recreio (5).

Um outro ponto relevante de entrada de fármacos no ambiente consiste na sua utilização em centros de saúde, hospitais e farmácias hospitalares, entre outros e a sua posterior eliminação pelo sistema de saneamento (2).

Normalmente os resíduos que vão para o sistema de saneamento são encaminhados para as estações de tratamentos de águas residuais (ETARs) onde irão sofrer processos físicos (remoção de lamas) e processos biológicos, através da degradação microbiana da matéria orgânica. No entanto, há estudos que apontam

## 1. Introdução

que muitos fármacos não sofrem degradação com os tratamentos convencionais de águas residuais (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Buser *et al.*, 1999; Kummerer, 2001; Castaglioni *et al.*, 2006; Ellis, 2006; Yu *et al.*, 2006; Al-Rifai *et al.*, 2009), sendo que cerca de 80% do total de fármacos que entram nas ETARs saem intactos (Ternes *et al.*, 1999; Ternes *et al.*, 1999). A introdução de fármacos no ambiente a partir das ETARs pode dar-se de várias formas. Uma delas consiste na utilização das águas tratadas para irrigação de campos de cultivo ou de recreio. Além disso, os efluentes das ETARs podem ser libertados nos sistemas de águas superficiais ou nos aquíferos, ou, devido a fenómenos anómalos de funcionamento e/ou caudais anormais decorrentes de tempestades, que podem levar à sua entrada directamente nos sistemas aquáticos (3b).

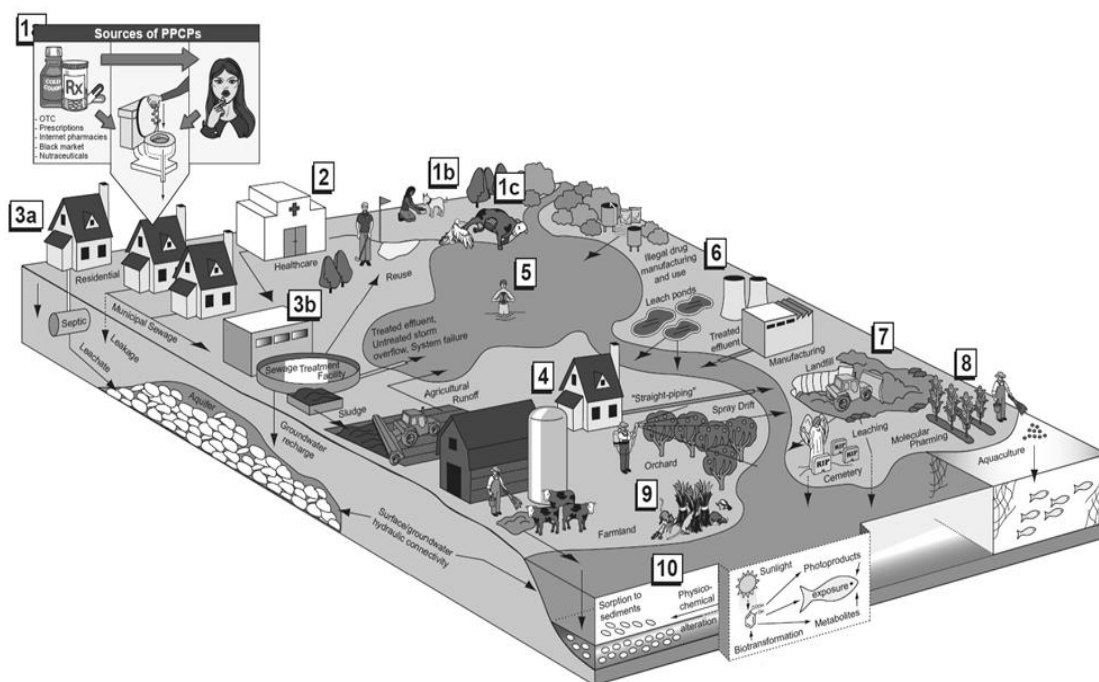


Figura 1: Vias de entradas dos fármacos no ambiente. 1) Consumo por humanos (1a) e animais (1b); 2) Libertação de resíduos tratados/não tratados para o saneamento; 3) Libertação de resíduos por ETAR's e fossas privadas; 4) Fertilização com as lamas resultantes das fossas; 5) Libertação directa no ecossistema aquático ao tomar banho ou em recreio; 6) Descarga/eliminação de resíduos provenientes de indústrias fabris de medicamentos legais e ilegais; 7) Deposição em aterros danificados de resíduos domésticos e lixiviação de cemitérios; 8) Libertação de pisciculturas; 9) Uso de produtos fitofarmacêuticos/drogas; 10) Destino e transformação dos fármacos no ambiente (Adaptado de <http://epa.gov/nerlesd1/chemistry/pharma/images/drawing.pdf>).

Outra das fontes de contaminação do meio por resíduos de fármacos pode residir na utilização das lamas activadas provenientes das ETARs e de resíduos produzidos em áreas domésticas para a fertilização de campos agrícolas, na

## 1. Introdução

utilização directa de produtos fitofarmacêuticos e, por fim, como resultado da medicação de animais domésticos ou gado (4).

As indústrias farmacêuticas quer licenciadas quer ilegais são outra fonte muito importante da introdução de fármacos no ambiente pela libertação de resíduos directamente nos cursos de água (6).

A utilização de aterros sanitários com construção deficiente leva a que os medicamentos descartados para o lixo nos lares sejam lixiviados para o ambiente. Esta lixiviação poderá igualmente ocorrer nos cemitérios (7).

O uso de fármacos ao nível de aquaculturas, quer seja por fontes de alimentação medicadas quer pelos produtos de excreção é outra via (8) de contaminação do meio aquático. A produção intensiva de culturas modificadas geneticamente para a produção de compostos benéficos para o Homem (*molecular pharming*) poderá ser um vector de entrada no ambiente desses compostos (8).

Um outro aspecto a considerar reside na libertação de fármacos com um duplo papel, que tanto são utilizados em medicina humana bem como no controlo de pestes. Assim, alguns destes compostos são libertados em elevada quantidade, como nos casos da 4-aminopiridina (usada como droga experimental na esclerose múltipla e como avicida), warfarina (usada como anticoagulante e como veneno para ratos), azacoleterol (usado como antilipidémico e como inibidor da reprodução de aves aviárias e roedores), alguns antibióticos (usados contra patogénicos dos pomares), acetaminofeno (usado como analgésico e como controlo da cobra das árvores), cafeína (usada como estimulante e como controlo do sapo do género *Eleutherodactylus*) (9).

Aquando da sua entrada no ambiente, os compostos parentais metabolizados são eventualmente transportados do compartimento terrestre para o aquático onde, dependendo do caudal sofrem uma diluição significativa. No entanto podem exercer efeitos nos diferentes organismos e podem sofrer uma série de reacções, que tanto podem neutralizar o seu efeito como transformá-los em compostos mais tóxicos. Estas reacções incluem, como por exemplo, serem fototransformados por acção directa ou indirecta dos raios UV, sofrerem alterações físico-químicas (*e.g.*, degradação e mineralização das moléculas), serem volatizados como no caso de alguns anestésicos gasosos (10).

### 1.1.3. Relevância e perigos

Os fármacos e os seus metabolitos são ubíquos no ambiente embora grande parte deles não seja persistente nem passível de serem bioacumulados, sendo alguns deles inclusivamente eliminados nas ETARs (Escher *et al.*, 2005). Além disso, os relatos que existem sobre a sua concentração no ambiente indicam níveis baixos na ordem dos  $\mu\text{g L}^{-1}$  (*e.g.*, águas de superfície; águas subterrâneas; zonas costeiras) (Kolpin *et al.*, 2002). No entanto, eles são continuamente libertados para os sistemas aquáticos e, deste modo, contribuem para uma sobrecarga de poluentes químicos, para além das suas propriedades bioactivas poderem pôr em risco os organismos aquáticos e, em última análise, o Homem (López-Serna *et al.*, 2010).

Um fármaco que está optimizado para actuar numa dada via fisiológica não exhibe necessariamente uma função similar num receptor análogo (ou função biológica) em organismos não alvo (Seiler, 2002). Além do mais é possível que alvos específicos similares em diversas espécies desencadeiem respostas diferentes em organismos diferentes (Seiler, 2002). No entanto para invertebrados, apesar de filogeneticamente distantes dos humanos, partilham funções altamente conservadas, como por exemplo a formação de ATP (Escher *et al.*, 2005). Um alvo biológico de um fármaco poderá ser uma molécula específica como por exemplo uma enzima ou um receptor, ou um local específico como por exemplo uma membrana biológica (Escher *et al.*, 2005). Basicamente existem três tipos de interacção entre um poluente e o seu alvo biológico (Escher *et al.*, 2002): interacções não específicas (1), específicas (2) e as reacções químicas (3). (1) Os poluentes podem ligar-se a alvos biológicos, por exemplo membranas biológicas, e interagir de forma não específica e não direccionada nas forças de Van der Waals ou como aceitadores/dadores de moléculas de Hidrogénio. (2) Se as mesmas forças estão espacialmente dirigidas ou se são possíveis interacções iónicas, fala-se em interacções específicas ou ajustamento estérico. Estes podem incluir inibições enzimáticas ou ligações específicas a receptores. (3) Reacções químicas entre poluentes e moléculas biológicas alvo são geralmente irreversíveis e podem danificar de forma permanente os lípidos, as proteínas ou o DNA (Escher *et al.*, 2005).

## 1. Introdução

Os compostos que sobrevivem às várias fases do metabolismo e a outras acções de degradação e sequestro podem ser um factor de risco para os organismos no ambiente. Até conjugados menos/não tóxicos (derivados glucoronidados) podem ser mais tarde novamente convertidos no composto parental através de glucoronoridases ou por hidrólise química. Alguns dos produtos metabolizados podem ser mais bioactivos do que os compostos parentais, como por exemplo compostos metabolizados por intermédio do sistema microssomal hepático. Assim sendo os conjugados podem funcionar como reservatórios dos quais os compostos parentais podem ser regenerados e posteriormente libertados para o ambiente (Daughton e Ternes 1999).

Os fármacos nunca ocorrem sozinhos no ambiente, mas sempre em combinação com outros compostos, não apenas outros fármacos, mas também com os seus metabolitos e outros poluentes ambientais, tais como químicos industriais, pesticidas ou produtos de cuidado pessoal (Escher *et al.*, 2005). Há estudos que demonstram que a mistura de fármacos pode exercer um efeito tóxico maior, igual ou menor, (que pode ser sinérgico, aditivo ou antagonista, respectivamente) do que seria esperado se se adicionasse a toxicidade individual de cada composto (Daughton e Ternes, 1999; Cleuvers, 2003; Carlsson *et al.*, 2006).

A natureza polar da maioria dos fármacos e seus metabolitos leva à fácil lixiviação destes compostos das áreas de deposição para a água subterrânea ou em tempo chuvoso, à sua escorrência para águas de superfície, tal como referido anteriormente. Os restantes compostos (os que são desenhados para ultrapassar a barreira hemato-encefálica) têm um carácter lipofílico, tornando-os propensos a bioconcentrar através do consumo de água ou bioacumular pelo consumo de alimento contaminado (Daughton e Ternes, 1999).

### 1.1.4. Metabolismo

A maior parte das substâncias aplicadas à população humana pode ser metabolizada no fígado, por intermédio das designadas reacções de fase I e II (James, 1986), sendo que esta metabolização é específica, ou seja depende do fármaco em questão (Weigel, 2003). As reacções de fase I fazem uso das monooxigenases (citocromo P450), redutases e hidrolases (para ésteres e epóxidos) para adicionar um grupo funcional reactivo à molécula. As reacções de



## 1. Introdução

fase II usam a conjugação covalente para tornar a molécula mais hidrofílica e mais facilmente excretável. Estas reacções são catalisadas por glicotransferases (UDP-glucuronosiltransferases) e arilsulfotransferases (para grupos hidroxiaromáticos e carboxilo), glutathione-S-transferase (para grupos funcionais electrofilicos como halogéneos, grupos nitrilo, ou então locais insaturados/conjugados), acetiltransferases (para aminas primárias ou hidrazinas) e aminoaciltransferases (para formação de péptidos a partir de grupos carboxilo usando aminoácidos livres). A estratégia metabólica gera metabolitos sucessivamente mais polares que o composto parental, aumentando deste modo a excreção (Daughton e Ternes, 1999). Enquanto que os metabolitos provenientes da fase I ainda possuem actividade farmacológica, por vezes superior à do composto parental, os metabolitos de fase II pelo contrário são na generalidade inactivos e prontamente eliminados (Weigel, 2003).

Este conjunto de produtos transformados, metabolitos e conjugados do metabolismo eucariótico e procariótico e de alterações físico-químicas que os fármacos sofrem no ambiente, adiciona a um já complexo conjunto, centenas de químicos altamente bioactivos (Daughton e Ternes, 1999).

### 1.1.5. Legislação

Existem apenas 2 grandes entidades no que diz respeito à gestão da libertação de fármacos no ambiente, a *European Medicines Agency* (EMA) e a *U. S. Food and Drug Administration* (FDA). São poucas as alternativas a estas duas abordagens na avaliação de risco ecológico que poderá advir à exposição a fármacos (Daughton e Ternes, 1999).

A estimativa directa dos efeitos causados por poluentes ambientais nos ecossistemas não é uma tarefa simples. Os protocolos de suporte à realização da avaliação de risco de compostos elaborados pela EMA são constituídos por duas fases, na primeira fase há uma estimativa da exposição no ambiente da substância. A segunda fase consiste na obtenção de informação acerca do seu destino e efeitos no ambiente, esta está dividida em duas partes, A e B (EMEA, 2006).

Relativamente à fase I de avaliação da exposição, esta deverá ser feita independentemente da sua via de administração, forma farmacêutica, metabolismo ou excreção. Todas as substâncias com um  $\log K_{ow} > 4,5$  devem ser avaliadas

## 1. Introdução

relativamente à sua persistência, bioacumulação e toxicidade de acordo com a EU TGD. O cálculo do PEC (*Predicted Environmental Concentration*) é restrito ao compartimento aquático (EMEA, 2006). No final, dependendo do valor obtido para o PEC existem dois caminhos. Caso este seja inferior a  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  e caso não existam mais nenhuma preocupação ambientalmente relevantes, assume-se que é improvável que a substância apresente um risco ambiental após a sua prescrição e possível libertação no ambiente. Pelo contrário, caso este valor seja superior a  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , deverá prosseguir-se para a análise de fase II (EMEA, 2006).

Na parte A da fase II avalia-se o rácio entre PEC/PNEC. O PNEC (*Predicted Non-Effect Concentration*) é calculado aplicando um factor de incerteza para extrapolar dados ecotoxicológicos laboratoriais para o ambiente, usando um restrito número de organismos (geralmente algas, cladóceros e peixes). No final e caso este rácio seja inferior a 1, não são necessários mais testes, visto que se assume que a droga ou os seus metabolitos não apresentam um risco para o ambiente aquático. Pelo contrário, caso este valor seja superior a 1, deverá proceder-se a uma nova avaliação de risco segundo a parte B da fase II de estudo de avaliação de risco. Nesta parte B o cálculo do PEC e PNEC do composto parental através da realização de ensaios mais robustos, que podem envolver o estudo dos metabolitos do fármaco, é refinado. No final há a compilação e integração dos dados gerados, o que permitirá classificar os fármacos em questão e ainda estabelecer restrições ao seu uso (por exemplo hospitalares; em cirurgias específicas, entre outros) (Straub, 2002; EMEA, 2006).

A abordagem descrita anteriormente é baseada em determinações laboratoriais de exposições a curto e longo prazo, sendo a sua maior valia a identificação e quantificação *a priori* do risco. No entanto, não reflecte necessariamente a situação real num ecossistema, já que muitos outros factores podem estar a interagir. Além do mais, até à data, há poucos estudos disponíveis dos seus efeitos directos nos ecossistemas reais (Pascoe *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2006; Fent *et al.*, 2006; Hernando *et al.*, 2006).

### 1.1.6. Considerações finais

Resumindo, concentrações ambientais altas podem ser expectáveis caso se verifiquem uma ou várias das condições seguintes, prescrição recorrente, doses

## 1. Introdução

elevadas, entrada de grandes quantidades e/ou baixas taxas de eliminação nas ETARs. A libertação de grandes quantidades de fármacos no ambiente é potencialmente perigosa visto que as drogas farmacológicas são desenhadas para despoletar um certo efeito biológico, sendo portanto expectável que interfiram com os respectivos receptores, enzimas, ou sistemas hormonais nos organismos não alvo (Weigel, 2003). De maneira a evitar a rápida metabolização dos fármacos antes de poderem chegar ao seu local de acção, ou para prolongar o tempo de residência no organismo, são geralmente incluídos grupos funcionais, como no caso de alguns estrogénios sintéticos. Isto faz com que o fármaco no ambiente seja mais persistente (Weigel, 2003). Ao contrário de outros poluentes ambientais, como por exemplo os pesticidas que são libertados de forma sazonal, os fármacos são introduzidos continuamente e directamente no sistema aquático. Até compostos com uma baixa persistência podem actuar como se fossem persistentes, pois os organismos não alvo podem estar continuamente expostos durante todo o seu ciclo de vida (Daughton e Ternes, 1999). Actualmente são usados regular e simultaneamente centenas de fármacos diferentes, susceptíveis de interagir e apresentar efeitos sinérgicos, desconhecidos (Cleuvers, 2003; Cleuvers, 2004; Richards *et al.*, 2004; Escher *et al.*, 2005; Pomati *et al.*, 2008). E por fim um dos factores mais importantes na problemática da análise dos resíduos de fármacos no ambiente reside na inexistência de dados relativos aos seus efeitos nos ecossistemas aquáticos, especialmente no que concerne exposições de longa-duração a baixas concentrações (Ginebreda *et al.*, 2010).

Um dos principais perigos que derivam da presença de fármacos e seus metabolitos no ambiente é o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos (Weigel, 2003). Quantidades significativas de bactérias resistentes a antibióticos foram observadas no sedimento marinho e em peixes expostos a efluentes de ETARs (Andersen e Sandaa, 1994; Mølbak *et al.*, 1999; Miranda e Zemelman, 2001). Apesar de este facto ser atribuído ao uso massivo de antibióticos na produção de gado e pisciculturas, a contribuição de antibióticos usados em medicina humana e veterinária é assinalável (Weigel, 2003).

A possibilidade de haver disrupção endócrina é outro dos potenciais perigos visto que, para além da excreção natural de estrogénios humanos, a administração com fins terapêuticos de hormonas sintéticas e naturais poderá

## 1. Introdução

levar a concentrações que podem ter efeitos biológicos. Estes efeitos já foram reportados em peixes usando concentrações inferiores às encontradas no ambiente (Weigel, 2003). Muitas drogas antineoplásicas são desenhadas para actuar como agentes alquilantes, podendo provocar genotoxicidade (Weigel, 2003).

Em algumas áreas foram detectados resíduos de compostos farmacológicos na água canalizada (Hirsch *et al.*, 1996; Heberer e Stan, 1997; Reddersen *et al.*, 2002), levando a uma exposição não controlada a estas substâncias. Muitos organismos, como por exemplo filtradores e bentónicos, possuem complexos de resistência a multixenobióticos (MXR) em áreas contaminadas. Este sistema remove compostos potencialmente tóxicos do seu organismo, mas pode ser inibido por vários fármacos, como por exemplo o verapamil, aumentando a susceptibilidade a outros poluentes (Daughton e Ternes, 1999).

Por fim os fármacos podem causar efeitos imprevistos ao nível do indivíduo, população e comunidades nos ecossistemas naturais (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Daughton e Ternes, 1999; Weigel, 2003; Escher *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2008; Gunnarsson *et al.*, 2008; Fick *et al.*, 2010; Ginebreda *et al.*, 2010; Jelic *et al.*, 2011).

A figura 2 resume o que foi dito anteriormente, relacionando os factores de exposição, destino e de efeitos nos organismos entre compartimentos.

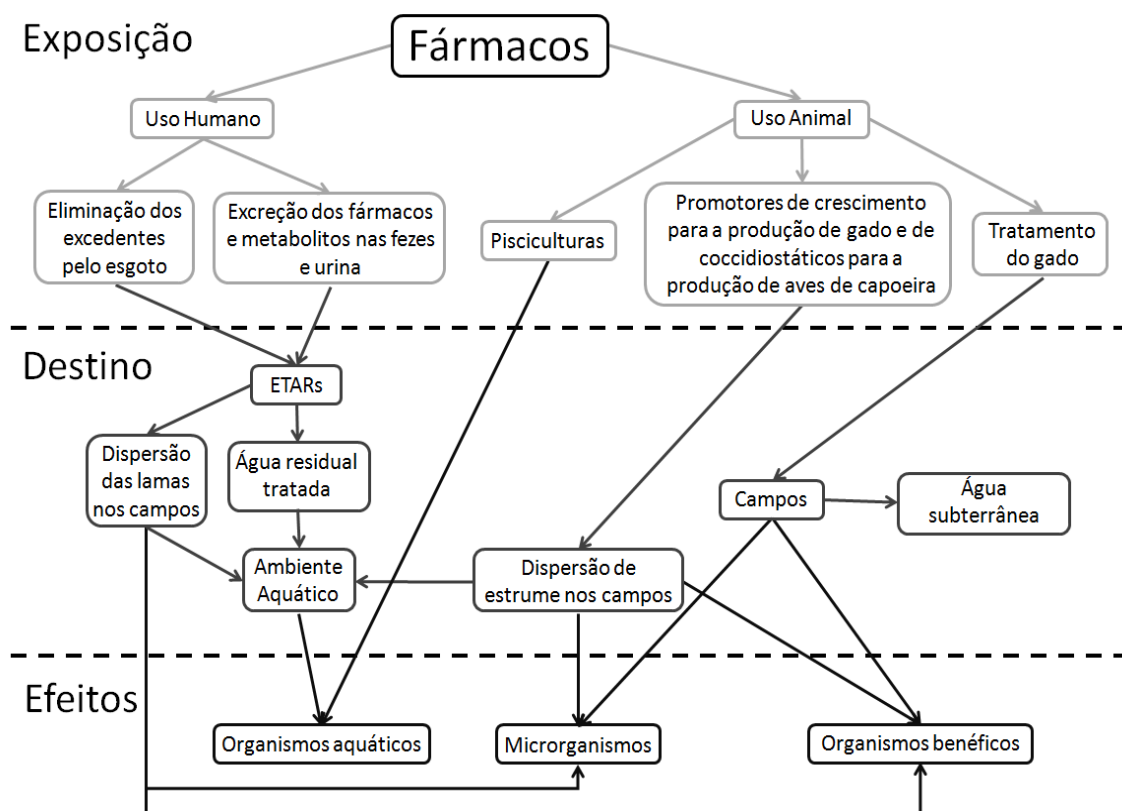


Figura 2: Vias de exposição de fármacos no ambiente (adaptado de Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

## 1.2. Fármacos em estudo

No desenvolvimento do trabalho experimental foram testados os efeitos de duas drogas anticolinesterásicas, a neostigmina (brometo) (figura 2A), 3-(N,N-Dimethylcarbamoyloxy)-N,N,N-trimethylanilinium e a piridostigmina (brometo) (figura 2B), 3-(Dimethylaminocarbonyloxy)-1-methylpyridinium, comumente usadas no tratamento de uma doença, a Miastenia grave. Na figura 3 estão representadas as estruturas dos dois fármacos estudados.

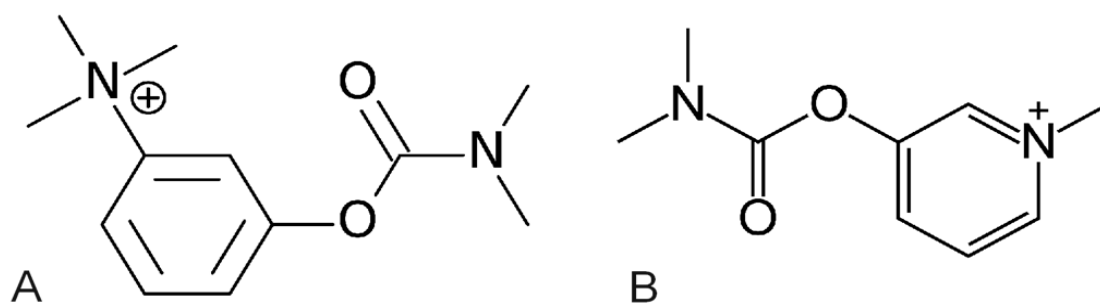


Figura 3: Estrutura química dos fármacos usados nos ensaios toxicológicos: A) neostigmina; B) piridostigmina (Adaptado de [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

## 1. Introdução

Tanto a neostigmina como a piridostigmina são espécies químicas que pertencem à família dos carbamatos e como tal, são capazes de inibir a actividade das colinesterases (Maquilonius *et al.*, 1983; Song *et al.*, 2002). No entanto e ao contrário de outros compostos a inibição que induzem é reversível (característica comum dos anticolinesterásicos derivados do ácido carbâmico), devido ao facto de serem degradados pelas colinesterases (Song *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2008).

Por apresentar esta reversibilidade, desde muito cedo foram usados como forma de tratamento da Miastenia grave (Flacke, 1973; Maquilonius *et al.*, 1983; Breyer-Pfaff *et al.*, 1985; Aquilonius e Hartvig, 1986; Abu-Qare e Abou-Donia, 2002; Song *et al.*, 2002), sendo o objectivo da sua utilização consiste em retardar a degradação da acetilcolina da junção mioneural e, deste modo, aumentar o tempo de semi-vida desta e aumentar o tempo de estimulação do músculo (Conti-Fine *et al.*, 2006; Kaminski, 2009). Mais recentemente, estes compostos foram usados durante a guerra do Golfo em soldados americanos pelo seu efeito profilático protector contra a intoxicação com agentes nervosos organosfosforados, inibidores irreversíveis das colinesterases, como o gás Sarin e Soman (Keeler *et al.*, 1991; Wenger *et al.*, 1993; Sapolsky, 1998; Young e Evans, 1998).

Relativamente às suas características, são dois compostos polares a pH fisiológico devido ao facto de terem um grupo amina quaternário (Song *et al.*, 2002) e instáveis a pH alcalino (Somani *et al.*, 1972). Tanto a piridostigmina como a neostigmina, como já foi referido anteriormente, são hidrolisadas pelas colinesterases, no entanto sabe-se que também podem ser metabolizadas por enzimas microsossomais do fígado (Tiwari *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram que os seus metabolitos não possuem actividade biológica (Aquilonius e Hartvig, 1986) ou uma actividade inibitória das colinesterases residual (Hennis *et al.*, 1984). Relativamente aos seus produtos de metabolização, para a neostigmina determinou-se que os dois metabolitos mais excretados na urina de rato foram a droga inalterada, neostigmina, e 3-hidroxifeniltrimetilpirimidium amónia (Somani *et al.*, 1970). Relativamente à piridostigmina, estudos usando urina de pacientes com Miastenia grave indicaram que os dois compostos mais excretados foram piridostigmina e 3-hidroxi-n-metilpiridinium. Também foi possível identificar, dihidroxi-n-metilpirimidium,

formado *in vivo* a partir do anterior e outro composto que poderá ser metoxi-n-metilpirimidium ou então acetoxi-n-metilpirimidium (Somani *et al.*, 1972).

### 1.3. Miastenia Grave

A Miastenia grave é uma doença crónica caracterizada por fadiga e fraqueza muscular flutuante dos músculos voluntários ou esqueléticos, devido a uma deficiência ao nível dos receptores de acetilcolina na junção neuromuscular. Estes sintomas são devidos maioritariamente ao desenvolvimento de uma resposta auto-imune (tipo II) mediada por anticorpos (IgGs) contra os receptores de acetilcolina, o que leva a um comprometimento e consequente mal funcionamento da transmissão neuromuscular (Goldsby *et al.*, 2000; Howard, 2008). Considera-se que a primeira pessoa a descrever os sintomas da doença terá sido um clínico Inglês, Sir Thomas Willis, no seu livro de 1672 “De anima Brutorum” (Howard, 2008). Em finais do século XIX com os trabalhos de Wilks (1877), Erb (1879), Oppenheim (1887), Goldflam (1893), Jolly (1895) foi possível definir bem a doença, sendo que apenas na década de 30, se realizaram estudos que permitiram verificar similaridades entre os sintomas da Miastenia grave e a envenenamento por curare, sugerindo deste modo um defeito ao nível da transmissão neuromuscular destes doentes. Estas descobertas levam Walker (1934, 1937) a tratar com sucesso os seus pacientes com recurso a inibidores das colinesterases (Howard, 2008).

### 1.4. Organismo teste: *Daphnia magna*

#### 1.4.1. Ecologia

Os cladóceros, dos quais *Daphnia* spp. (Filo: Arthropoda; Subfilo: Crustacea; Classe: Branchiopoda; Subclasse: Phyllopoda; Ordem: Diplostraca; Subordem: Cladocera; Família: Daphniidae) fazem parte, são geralmente denominados como pulgas de água. São um grupo muito importante dentro do zooplâncton, geralmente restrito a ecossistemas aquáticos de água doce lênticos (Arnér e Koivisto, 1993) ou com valores de salinidade inferiores a 1 g L<sup>-1</sup> (Hart 1991) e valores de condutividade abaixo de 500 µS cm<sup>-1</sup> (Hebert 2002).

*Daphnia* spp. são pequenos cladóceros pelágicos muito utilizadas como organismos de teste em estudos de ecotoxicologia aquática, sendo *Daphnia magna*

## 1. Introdução

e *Daphnia pulex* as mais usuais. Estas duas espécies possuem uma morfologia e ecologia similares, no entanto *D. magna* vive usualmente em águas duras ou moderadamente duras, acima de 80 mg L<sup>-1</sup>, em lagos e lagoas (Lynch, 1983; Pennak, 1989).

As populações de *Daphnia* spp. são geralmente pequenas (uma fêmea de *Daphnia magna* adulta pode atingir um tamanho entre os 5 e 6 mm) e desaparecem durante o Inverno e no início da Primavera, mas a subida da temperatura (acima dos 12°C) pode levar a um aumento da densidade destes organismos, podendo chegar a cerca de 200-500 organismos L<sup>-1</sup> (Pennak, 1989). Contudo há muitos factores, bióticos e abióticos, que determinam estas flutuações das densidades populacionais de zooplâncton no geral e de *Daphnia* em particular: parâmetros climatéricos como a temperatura e a luz (Berberovic *et al.*, 1990; Straile e Geller, 1998; Alekseev e Lajus, 2009), pH, condições de oxigénio e outros parâmetros de qualidade da água (Krause-Dellin e Steinberg, 1986), condições tróficas (qualidade e quantidade de alimento) (Geller, 1975; Moore, 1980; Rohrlack *et al.*, 1999; Muller-Navarra, 1995; Martin-Creuzburg *et al.*, 2006; Martin-Creuzburg *et al.*, 2008) e a predação por peixes ou invertebrados (Vanni, 1986; Lampert, 1993). E mesmo estes factores criam um complexo emaranhado de interacções (Gyllström e Hansson, 2004).

A densidade populacional destes organismos geralmente decresce durante os meses de verão em resposta às condições ambientais e voltam a aumentar no Outono, seguindo-se nova descida no Inverno (Jonczyk e Gilron, 2005; Abrantes *et al.*, 2006; Castro e Gonçalves, 2007). Durante o ano as populações são constituídas sobretudo por fêmeas, enquanto que os machos são abundantes na Primavera e no final do Outono. A produção de machos parece ser induzida por condições adversas, nomeadamente, baixas temperaturas, altas densidades populacionais e fracas condições tróficas levando a uma subsequente acumulação de produtos de excreção e/ou à diminuição de alimento disponível (Jonczyk e Gilron, 2005).

### 1.4.2. Ciclo reprodutivo

*D. magna* reproduz-se por partenogénese cíclica (figura 4), no qual uma alteração de certos factores ambientais, como luz, alimento entre outros, induzem



## 1. Introdução

a produção de machos, que contribuem para a variabilidade genética dos juvenis durante a fase de reprodução sexuada (Zaffagnini, 1987).

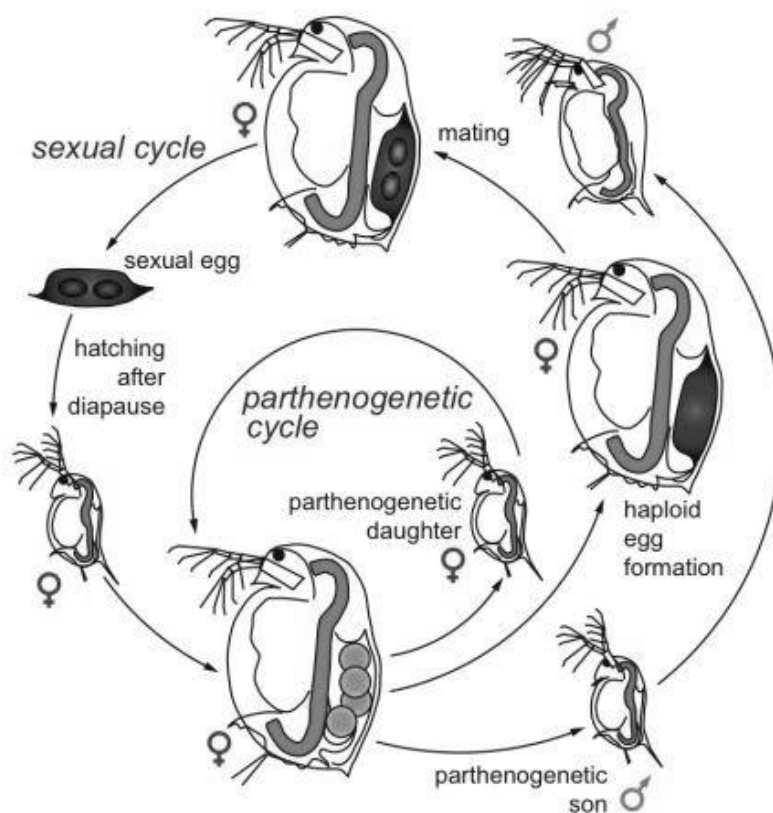


Figura 4: Esquema representativo do ciclo de vida da *Daphnia magna*, quer a sua componente sexual quer partenogênica (Ebert, 2005).

No laboratório, os dafnídeos são mantidos num estado partenogénico, onde ovos diplóides desenvolvem-se em fêmeas adultas. A oogénese neste caso não é nem estritamente meiótica nem estritamente mitótica. No entanto, não há recombinação durante o fenómeno de partenogénese e portanto a sua descendência é geneticamente igual à progenitora (Hebert, 1987). Quando as culturas passam por um stress físico (sobrepopulação, pouco e mau alimento, variações de temperatura) a produção de machos é comum, já que as dáfrias se reproduzem sexualmente produzindo *ephippia* (Jonczyk e Gilron, 2005).

Existem 3 estágios distintos no ciclo de vida das dáfrias, ovo; juvenil e adulto. O ciclo de vida das dáfrias depende essencialmente das condições ambientais e geralmente aumenta quando a temperatura diminui (vive cerca de 40 dias a 25°C e 56 a 20°C). Relativamente à produção de ovos, estes são geralmente entre os 6 e 10 ovos por ninhada, que eclodem no marsúpio 2 a 3 dias após a sua

## 1. Introdução

formação e a formação da carapaça externa das mães. Os neonatos atingem a maturação 6-14 dias após o nascimento, sendo que este tempo depende em primazia do tamanho dos neonatos e das condições a que estão expostos (Jonczyk e Gilron, 2005).

### 1.4.3. Alimentação

Sob condições naturais os dafnídeos alimentam-se predominantemente de algas e bactérias por filtração (Lampert, 2006; Dodson e Hanazato, 1995).

As populações de *Daphnia* têm a capacidade de remover porções significativas de algas de lagos, a uma taxa na ordem dos 4 mL h<sup>-1</sup> (Dodson e Frey 1991). A filtração de partículas é facilitada pelo batimento ritmado de 4 patas torácicas morfológicamente complexas que se encontram no interior da carapaça na região ventral (com uma fila uniforme de 20 ou mais dentes no pectíneo médio), gerando uma corrente que transporta água oxigenada e permite a respiração e alimentação das dáfias (Peñalva-Arana *et al.*, 2007).

As taxas de alimentação são sensíveis a variações de temperatura, à concentração de oxigénio, à qualidade física (*e.g.*, pH) e química (*e.g.*, nutrientes) da água, à intensidade luminosa e ao tamanho do corpo (Starkweather, 1983).

### 1.4.4. Testes ecotoxicológicos

A utilização de *D. magna* em testes toxicológicos remonta aos anos 70 (Jonczyk e Gilron, 2005) sendo também utilizadas para estudos nas áreas de ecologia e fisiologia (Preuss, 2009). Tem sido usada para avaliar várias classes de poluentes (Allen *et al.*, 1995; Barata e Baird, 2000; McWilliam e Baird, 2002; Barata *et al.*, 2007), incluindo os fármacos (Lilius *et al.*, 1993; Calleja *et al.*, 1995; Knol 1995; Flaherty e Dodson, 2005), servindo de base à tomada de decisão em processos de regulamentação ambiental em muitos países (Lilius *et al.*, 1994). A sua utilização como organismo modelo em ecotoxicologia deve-se a uma série de características, como a sua sensibilidade a diferente compostos, relevância ecológica, facilidade de manuseio e manutenção laboratorial, existência de protocolos padronizados, ciclo de vida curto e taxas de reprodução elevadas são algumas delas (Münzinger e Monicelli, 1992).

## 1. Introdução

A avaliação de efeitos tóxicos em organismos aquáticos inclui geralmente testes de toxicidade crónica, aguda e sub-letal (Day e Kaushik, 1987). Com os testes de toxicidade aguda procura-se determinar a percentagem de sobrevivência dos organismos quando expostos, durante um curto período de tempo, a concentrações elevadas de um composto, sendo que nos ensaios crónicos estudam-se efeitos ao nível da reprodução e taxas de crescimento dos animais expostos a concentrações sub-letais (Jonczyk e Gilron, 2005). Com o aumento das descargas de contaminantes nos ecossistemas aquáticos e da necessidade de se perceber e avaliar os efeitos biológicos de xenobióticos nos organismos aquáticos, têm vindo a desenvolver-se indicadores sub-letais de stress bioquímico que forneçam uma resposta precoce. Recentemente tem-se dado muita atenção aos processos fisiológicos/energéticos em organismos não alvo como um indicador sensível de situações de stress (Villarroel *et al.*, 2009). Neste sentido um grande número de estudos tem sido realizado usando biomarcadores como ferramentas funcionais para avaliar a toxicidade destes compostos em populações naturais e a níveis de organização infraindivíduo. Estes estudos tentam também extrapolar as possíveis implicações que os seus efeitos terão em níveis de organização superiores (Walker, 2001).

A actividade das colinesterases (ChE) tem sido usada como um biomarcador em testes de toxicidade em várias espécies (Sturm, 2000), incluindo *D. magna* (Guilhermino *et al.*, 1996b). Vários estudos indicaram que as colinesterases são sensíveis a diferentes tipos de contaminantes ambientais, tais como metais, detergentes, e misturas complexas de poluentes (Gill *et al.*, 1990; Guilhermino *et al.*, 1996b; Payne *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 1998; Guilhermino *et al.*, 2000). A sua inibição causa uma acumulação da acetilcolina nas sinapses levando a uma disrupção da função nervosa, podendo resultar na morte do organismo (Peakall, 1992). As ChE dividem-se em 2 grupos, as acetilcolinesterases (AChE) (EC 3.1.1.7) e as butirilcolinesterase ou pseudocolinesterases (PChE) (EC 3.1.1.8) (Eto, 1974). De acordo com Diamantino *et al.* (2003) as colinesterases de *D. magna* mostram características de ambas as colinesterases, acetilcolinesterases (AChE) e pseudocolinesterases (PChE). Como as colinesterases ainda não foram isoladas de *Daphnia*, permanece a incerteza acerca se *Daphnia* possui um tipo de colinesterase atípica ou se contém ambas as colinesterases, AChE e PChE (Li e Tan, 2011).

## 1. Introdução

Os ensaios de curto prazo, entre as 4 e as 24 horas, das respostas alimentares de *D. magna*, baseados nas taxas de remoção de algas têm sido usados com sucesso para prever efeitos sub-letais e consequências a longo termo de uma variedade de poluentes no laboratório e em estudos de campo (Allen *et al.*, 1995; Barata e Baird, 2000; McWilliam e Baird, 2002; Barata *et al.*, 2007). Em *Daphnia* e noutros organismos aquáticos, a alimentação está fisiologicamente ligada ao crescimento e reprodução, e geralmente os efeitos a este nível traduzem-se em efeitos populacionais (Barata e Baird, 2000). Além do mais, está demonstrado que contaminantes orgânicos e inorgânicos são capazes de prejudicar rapidamente as taxas de alimentação, um processo que poderá estar relacionado com a adsorção do contaminante às algas ou à ingestão de partículas alimentares e posterior desregulação do funcionamento do tubo digestivo (Taylor *et al.*, 1998; Barata *et al.*, 2002, Taylor, 2002).

### 1.5. Objectivos

O desenvolvimento do trabalho experimental incluído na presente tese pretende colmatar a quase completa inexistência de dados ecotoxicológicos relativamente a dois fármacos com actividade anticolinesterásica, a neostigmina e a piridostigmina, recorrendo a uma avaliação de diferentes processos chave no ciclo de vida e em mecanismos fisiológicos de *D. magna*.

Assim sendo, os principais objectivos foram o estudo dos efeitos tóxicos agudos e crónicos da piridostigmina e da neostigmina na sobrevivência e ciclo de vida de *D. magna*, respectivamente. Pretendeu-se igualmente avaliar os efeitos neurotóxicos de piridostigmina e neostigmina na actividade de colinesterases em *D. magna*. Simultaneamente, avaliaram-se os efeitos da exposição à piridostigmina e à neostigmina ao nível do comportamento alimentar, recorrendo para isso ao estudo de variações nas suas taxas de ingestão e filtração quando expostas a curto prazo aos fármacos. Por fim integraram-se diferentes respostas biológicas, de modo a averiguar possíveis impactos destas substâncias em ambientes aquáticos, tendo em conta cenários de exposição reais.



## 2. Material e métodos

### 2.1. Fármacos e concentrações testadas

Os fármacos, de neostigmina (brometo) (CAS - 114-80-7; grau de pureza  $\geq 98\%$ ) e de piridostigmina (brometo) (CAS - 101-26-8; grau de pureza  $\geq 98\%$ ) foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich Química SA. Outros compostos usados durante o desenvolver do trabalho,  $K_2HPO_4$  (grau de pureza  $\geq 98\%$ ), DTNB e acetiltiocolina (grau de pureza  $\geq 98\%$ ) Sigma-Aldrich Química SA.  $KH_2PO_4$  (grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ),  $NaHCO_3$  (grau de pureza  $\geq 99\%$ ), KCl (grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ) e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (grau de pureza  $\geq 99\%$ ) Merck.

As soluções de teste para os ensaios agudos, crónicos, enzimáticos e alimentares foram obtidas por diluição de uma solução-mãe previamente preparada com meio igual ao utilizado nos testes (meio ASTM).

Após ensaios preliminares, que visaram definir gamas óptimas de concentração para realizar as exposições laboratoriais, as concentrações escolhidas para os ensaios agudos foram, 42,3; 52,8; 79,3; 118,9; 178,3; 267,5 e 401,2  $\mu g L^{-1}$  para a neostigmina e de 26; 38,9; 58,7; 87,9; 131,7; 197,5 e 296,3  $\mu g L^{-1}$  para a piridostigmina. Nos ensaios crónicos usaram-se as concentrações de 0; 2,62; 3,93; 5,24; 10,48; 20,97; 31,45 e 41,93  $\mu g L^{-1}$  para a neostigmina e de 0; 1,45; 2,15; 2,85; 5,7; 11,4; 17,1 e 22,8  $\mu g L^{-1}$  para a piridostigmina. Relativamente aos ensaios enzimáticos e de comportamento alimentar foram utilizadas as concentrações de 0; 2,62; 5,24; 10,48; 20,97 e 41,93  $\mu g L^{-1}$  para a neostigmina e de 0; 1,45; 2,85; 5,7; 11,4; 22,8  $\mu g L^{-1}$  para a piridostigmina.

### 2.2. Manutenção das culturas

As culturas de *Daphnia magna* (clone A *sensu* Baird *et al.*, 1989), construídas por cerca de 30 indivíduos cada, foram mantidas em frascos de 800 mL num meio de cultura artificial de elevada dureza - ASTM (ASTM, 1980; EPA, 1989) (consultar em anexo a constituição do meio ASTM, Anexo 2) e com um aditivo orgânico obtido a partir de extracto de algas, nomeadamente de *Ascophylum nodosum* (Linnaeus) (Le Jolis, 1863, Baird *et al.*, 1988), preparado por diluição de uma solução-mãe (Soares, 1989), e adicionado ao meio de cultura numa concentração de 6 mL  $L^{-1}$ . As

## 2. Material e métodos

culturas eram alimentadas e o meio de cultura renovado três vezes por semana. O alimento consistiu numa suspensão de algas, *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) (Hindák, 1990), cultivadas em laboratório em meio MBL (Stein, 1973) (consultar em anexo a constituição do meio MBL, Anexo 1), ressuspensas em ASTM e armazenadas no frigorífico até à sua utilização. O alimento era adicionado às culturas de *Daphnia* numa concentração de cerca de  $3,0 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>.

Ao fim da 5<sup>a</sup> ninhada os neonatos obtidos eram utilizados para iniciar novas culturas, dado que os organismos provenientes da 6<sup>a</sup> ninhada e seguintes são de menor qualidade. Por esta razão, todos os ensaios foram realizados com neonatos provenientes de organismos parentais entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> ninhada inclusive. As culturas foram mantidas sem arejamento, com um fotoperíodo de 16<sup>L</sup>:8<sup>E</sup> horas e a uma temperatura de 20±1°C.

### 2.3. Desenho experimental (testes com *D. magna*)

#### 2.3.1. Ensaaios agudos

Os neonatos foram mantidos em frascos de vidro de 60 mL durante 48 horas, com um volume final de 25 mL (os volumes de ASTM e de solução-mãe de neostigmina e piridostigmina variavam de acordo com a concentração testada). Cada concentração testada foi composta por 4 réplicas, sendo que cada réplica continha 5 neonatos com idade inferior a 24 horas. As condições de exposição foram as mesmas que foram descritas anteriormente para a manutenção de culturas, com a excepção de que os neonatos não foram alimentados durante o período da exposição. O pH foi medido no início e no final do ensaio, para validação das condições do teste (OECD, 2000). Após 48 horas, o número de neonatos imobilizados foi determinado, sendo considerados imóveis os neonatos que ao fim de 15 segundos, após uma ligeira agitação do frasco, não se movessem. Os ensaios foram concretizados de acordo com as orientações da OCDE para testes agudos de imobilização (OCDE, 2000).

#### 2.3.2. Ensaaios crónicos

Os neonatos foram mantidos em frascos de vidro de 60 mL durante 21 dias, com um volume final de 50 mL (os volumes de ASTM e de solução-mãe de neostigmina e piridostigmina variavam de acordo com a concentração testada).

## Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*

### 2. Material e métodos

Para cada concentração usaram-se 10 réplicas individuais de neonatos com menos de 24 horas de idade. As condições experimentais foram as mesmas que foram descritas para a manutenção das culturas, assim como o regime alimentar, apesar de serem alimentados pelo menos cinco vezes por semana. A renovação das concentrações do ensaio era realizada a cada 2 dias, sendo preparada uma nova solução-mãe em cada mudança. Tal permitiu renovar a quantidade de tóxico, bem como eliminar os produtos de excreção dos organismos. Os valores de pH foram medidos no início e no final do ensaio para averiguar que não seriam factores limitantes das respostas observadas (OCDE, 1996). A mortalidade dos animais parentais e o número de neonatos foram anotados diariamente. Durante o teste, os parâmetros escolhidos para avaliar os efeitos na reprodução foram: número médio de neonatos produzidos por fêmea (fecundidade), crescimento somático, crescimento intrínseco populacional, número e tamanho das ninhadas, idade à maturação, idade à primeira reprodução, tamanho médio de 3 neonatos da primeira ninhada. O crescimento foi determinado medindo o comprimento, com o auxílio de uma lupa com lente micrométrica (Olympus SZX9), do primeiro segmento da segunda antena (exopódito) (*A*) no início do ensaio e ao fim de 21 dias. O tamanho do corpo de *D. magna* (*T*) foi obtido através de uma relação alométrica de acordo com o descrito por Pereira *et al.*, (2004):

$$T = 10,499.A - 0,329 \text{ (mm)} \text{ (} r^2=0,9392 \text{)}$$

A taxa de crescimento somático foi determinada de acordo com:

$$\text{Taxa de crescimento somático} = [\ln(T_f) - \ln(T_i)] / \Delta t$$

onde,  $T_f$  é o tamanho final do organismo (mm) após 21 dias de ensaio, o  $T_i$  é o comprimento do corpo no início do ensaio e o  $\Delta t$  é o intervalo de tempo do ensaio (dias) (Sobral, 1997; Burns, 2000). Por outro lado foi também calculado a taxa de crescimento da população ( $r$ , dia<sup>-1</sup>) pela equação de Euler-Lotka:

$$\sum e^{-r \cdot x} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

onde,  $x$  é a classe etária (dias; 0... $n$ ),  $l_x$  é a probabilidade de sobrevivência na idade  $x$  e  $m_x$  a fecundidade na idade  $x$ . As derivações foram determinadas de acordo com a técnica de Jackknife (Meyer *et al.*, 1986).



### 2.3.3. Ensaaios enzimáticos

Os neonatos foram mantidos em frascos de vidro de 500 mL durante 48 horas, com um volume final de 300 mL (os volumes de ASTM e de solução-mãe de neostigmina e piridostigmina variavam de acordo com a concentração testada). Cada concentração testada foi composta por 5 réplicas, sendo que cada réplica continha 35 neonatos com idade inferior a 24 horas. As condições de incubação foram as mesmas que foram descritas anteriormente para a manutenção de culturas, com a excepção de que os neonatos não foram alimentados. O pH foi medido no início e no final do ensaio. Após 48 horas os neonatos foram transferidos para tubos *ependorf*, secos da solução de teste à qual tinham sido previamente expostos e armazenados a -20°C até serem homogeneizados. Este passo envolveu adicionar aos organismos-teste 500 µL de tampão fosfato (0,1 M; pH = 7,2) e posterior homogeneização num homogeneizador rotativo a 14000 rpm, em gelo. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 6000 rpm durante 3 minutos, a 4°C. Todos os passos subsequentes ao isolamento foram realizados no gelo para evitar degradação proteica por proteases. A determinação da actividade colinesterásica envolveu o protocolo descrito por Ellman *et al.* (1961); estudos anteriores (Diamantino *et al.*, 2003) indicam que as colinesterases presentes nos tecidos de *D. magna* possuem propriedades hidrolíticas intermédias. Este método permite avaliar a actividade colinesterásica pelo facto de estas hidrolizarem a acetiltiocolina em acetato e tiocolina, sendo que esta última complexa com o DTNB, dando origem a um composto de cor amarelada, cuja formação pode ser determinada. Essa determinação foi realizada numa placa de 96 poços a 412 nm no espectofotómetro Thermo Scientific Multiskan EX (Ascent Software 2.6). O protocolo anteriormente referido envolve então a adição de 250 µL de solução de reacção (composta por tampão fosfato (0,1 M e pH = 7,2), + DTNB + acetiltiocolina) a 50 µL de amostra. As leituras foram feitas 10 e 15 minutos após a adição da solução de reacção.

De modo a expressar a actividade enzimática em função do conteúdo de proteína solúvel total das amostras (critério normalizador), foi necessário quantificar este parâmetro. A determinação da concentração de proteína solúvel total foi feita utilizando um método colorimétrico, descrito por Bradford (1976) com utilização do reagente de Bradford da Biorad, sendo que a recta de calibração

foi obtida utilizando diferentes diluições da proteína padrão,  $\gamma$ -globulina bovina, a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . As leituras das absorvâncias foram feitas em placas de 96 poços, utilizando  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra e  $250 \text{ }\mu\text{L}$  de reagente de Bradford, num espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan EX (Ascent Software 2.6) a  $595 \text{ nm}$ .

#### 2.3.4. Ensaios de comportamento alimentar

A avaliação do comportamento alimentar foi realizado em duas fases, uma primeira fase de exposição e uma segunda de recuperação. Na fase de exposição, colocaram-se os neonatos obtidos de culturas não expostas a fármacos em frascos contendo as diferentes concentrações de fármacos testadas. Na fase de recuperação, colocaram-se os neonatos provenientes de culturas que estiveram expostas às diferentes concentrações testadas do fármaco desde o seu início. Os organismos para o teste correspondiam à 3ª ninhada. Os neonatos foram mantidos em frascos de vidro de  $60 \text{ mL}$  durante 5 horas, com um volume final de  $50 \text{ mL}$  (na primeira fase os volumes de ASTM e de solução-mãe de neostigmina e piridostigmina variavam de acordo com a concentração testada, na segunda fase foram colocados em  $50 \text{ mL}$  de ASTM). Cada concentração testada era composta por 5 réplicas, sendo que cada réplica continha 10 neonatos com idade inferior a 24 horas. Os ensaios foram realizados no escuro com uma concentração de algas de cerca de  $9,0 \times 10^5 \text{ células mL}^{-1}$ . Para a determinação das concentrações iniciais e finais de algas foi retirada uma alíquota de  $900 \text{ }\mu\text{L}$  da suspensão de algas do frasco de ensaio e transferida para um *ependorf* contendo  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de Solutio de Lugol (Panreac Química S.A.U.). As contagens foram feitas num hematocítómetro (câmara de Neubauer) ao microscópio óptico (Leitz HM-LUZ3). No início e no fim do ensaio foram determinadas as concentrações de algas, sendo posteriormente calculadas as taxas de ingestão e de filtração de acordo com as fórmulas preconizadas na bibliografia (Gaul, 1951):

$$F = [(V n^{-1}) \cdot \{(\ln C_i - \ln C_f) t^{-1}\} - A]; A = [(\ln C_i - \ln C_f) t^{-1}]; I = \sqrt{C_i \cdot C_f}$$

Onde  $F$  é a taxa de filtração ( $\mu\text{L indivíduo}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ),  $I$  a taxa de ingestão (células  $\text{indivíduo}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ),  $C_i$  a concentração inicial de células ( $\text{células } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $C_f$  a concentração final de células ( $\text{células } \mu\text{L}^{-1}$ ),  $t$  o tempo (h),  $n$  o número de neonatos do ensaio

(10),  $V$  o volume ( $\mu\text{L}$ ) do ensaio e o  $A$  o factor de correlação para variações entre o controlo e a concentração final, *Cf*.

## 2.4. Análise estatística

Para cada teste agudo de imobilização, o número de organismos imobilizados foi traçado contra as diferentes concentrações testadas e os  $\text{EC}_{50}$  às 48 horas e respectivos intervalos de confiança (a 95%) foram calculados através de uma análise *Probit* usando o *software* SPSS versão 19 (IBM) (Finney, 1971).

A obtenção de diferenças significativas,  $P < 0,05$ , para as actividades enzimáticas, taxas de ingestão e de filtração foram obtidas usando análises ANOVA de uma via, seguidas de testes de comparação múltipla pela aplicação do teste de *Dunnett*, entre o controlo e as diferentes concentrações (Zar, 1996). Para a obtenção de diferenças significativas entre os ensaios de exposição e de recuperação foram obtidas usando testes-t com um intervalo de confiança de 95%.

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{EC}_{50}$  e respectivos intervalos de confiança (a 95%) foram calculados através de uma análise *Probit* após a transformação dos dados em percentagem de inibição usando o *software* SPSS versão 19 (IBM) (Finney, 1971).

Relativamente aos ensaios crónicos, os LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* – Concentração de efeitos observados) e NOEC (*No Observed Effect Concentration* – Concentração de efeitos não observados) para a reprodução e taxas de crescimento foram obtidos usando análises ANOVA de uma via, seguidas de testes de comparação múltipla de *Dunnett*, entre o controlo e as diferentes concentrações (Zar, 1996).

As análises estatísticas relativas aos testes-t e das ANOVAs foram realizadas no programa de *software* GraphPad Prism 5.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Aspectos gerais

Este trabalho apresenta a compilação de resultados de ensaios agudos e crónicos, que envolveram o estudo da actividade colinesterásica, de parâmetros alimentares (taxas de ingestão e filtração) e de reprodução, para dois compostos com actividade anticolinesterásica - a neostigmina e a piridostigmina - os quais são utilizados no tratamento da Miastenia grave. A escolha destes compostos deve-se em parte à escassa informação ecotoxicológica. Devido à avaliação de vários parâmetros a nível letal e sub-letal, este estudo constitui uma abordagem mais abrangente e inovadora, na medida em que foram determinados efeitos a diferentes níveis de organização biológica, o que permite dar uma resposta mais integradora dos efeitos que estes dois compostos, neostigmina e piridostigmina, têm ao nível de *D. magna*.

#### 3.2. Ensaios agudos

Numa primeira fase e de forma a obter um valor de  $EC_{50}$  realizaram-se ensaios preliminares onde se expuseram neonatos de *D. magna* a uma gama de concentrações dos dois compostos.

Na tabela I são apresentados os valores de  $EC_{50}$  - 48 h e dos intervalos de confiança, obtidos para a neostigmina e a piridostigmina.

Tabela I: Valores de  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e dos intervalos de confiança (entre parênteses; 95% probabilidade) obtidos para *D. magna* às 48 horas de exposição a neostigmina e a piridostigmina.

$EC_{50}$ - 48 h Imobilização <i>D. magna</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
neostigmina	piridostigmina
167,7	91,3
(147,28 - 194,44)	(82,61 - 101,39)

O valor de  $EC_{50}$  - 48 h obtido neste ensaio para a neostigmina foi cerca de cinco vezes menor do que o valor de  $LC_{50}$  - 24 h obtido no trabalho de Zobov *et al.*, (2005). Esta diferença poderá residir na diferença do tempo de duração dos ensaios entre os dois trabalhos. No entanto não se poderá descurar o facto de as

### 3. Resultados e discussão

experiências terem sido realizadas com formulações diferentes do mesmo composto químico: enquanto neste trabalho foi usada a forma de brometo, Zobov *et al.* (2005) usaram a formulação de metilsulfato. Sabe-se que o ião brometo em solução é tóxico para vários organismos, de entre os quais *D. magna* (Flury e Papritz, 1993). Relativamente ao valor de  $EC_{50}$  - 48 h calculado para a piridostigmina, devido à ausência de estudos, não é possível fazer uma comparação directa de valores.

Comparando os  $EC_{50}$  obtidos para os dois compostos testados podemos verificar que o valor obtido para a piridostigmina é quase metade do obtido para a neostigmina. Isto poderá dever-se ao facto de a piridostigmina ter um tempo de semi-vida em humanos superior ao da neostigmina (Maquilonius *et al.*, 1983), logo é mais dificilmente degradada pelas colinesterases, algo que estes resultados parecem apontar que ocorra também em *D. magna*.

A inexistência de estudos ecotoxicológicos utilizando estes dois fármacos, contrasta com os estudos toxicológicos abundantes desenvolvidos em ratinhos, coelhos, gatos e mesmo cães (Randall e Lehmann, 1950; Heyl *et al.*, 1980; Deyi *et al.*, 1981), o que é justificável por estes compostos serem usados em medicina humana. Relativamente à piridostigmina, um estudo anterior demonstrou que o  $LC_{50}$  - 24h calculado para náuplios de cirrípedes como *Balanus amphitrite*, é superior a  $25\,000\,\mu\text{g L}^{-1}$  (Ong Samuel, comunicação pessoal). Esta maior sensibilidade de *D. magna* a compostos inibidores das colinesterases, como organofosforados e carbamatos, comparativamente a outros organismos como algas, peixes e insectos encontra-se referida na literatura (Scholten *et al.*, 2005).

Comparando os  $EC_{50}$  - 48 h obtidos para *D. magna* relativamente aos dois compostos em estudo com outros compostos inibidores das colinesterases ( $EC_{50}$  - 48 h em *D. magna*) como insecticidas organofosforados, por exemplo paratião ( $\approx 2\,\text{mg L}^{-1}$ ), chlorpirifos ( $\approx 1\,\text{mg L}^{-1}$ ), malatião ( $\approx 3\,\text{mg L}^{-1}$ ) e acefato ( $\approx 56\,\text{mg L}^{-1}$ ) e carbamatos, por exemplo propoxur ( $\approx 94\,\text{mg L}^{-1}$ ) (Printes e Callaghan, 2004), mostram uma menor toxicidade em *D. magna* quando comparados com os compostos testados neste estudo.

### 3.3. Ensaios Enzimáticos

O aumento das descargas de contaminantes ambientais nos ecossistemas e a morosidade dos testes convencionais crónicos relativos à avaliação de efeitos sub-letais (*e.g.*, na reprodução), levou a que fossem desenvolvidos e utilizados vários indicadores sub-letais de stress bioquímico de resposta rápida, como ferramentas de avaliação da toxicidade destes compostos em populações naturais; muitos destes efeitos podem ser avaliados a um nível de organização biológica infra-indivíduo (Walker, 2001; Villarroel *et al.*, 2009). A actividade colinesterásica tem sido usada com sucesso em *D. magna* como biomarcador de exposição a organofosforados e carbamatos (Scholten *et al.*, 2005; Printes e Callaghan, 2006; Veselá, 2006). Como os dois compostos em estudo possuem como propriedade farmacológica a inibição da acetilcolinesterase (AChE), fez sentido que a inibição das colinesterases fosse utilizada como critério toxicológico. No caso particular da espécie em estudo, é possível afirmar, com base em estudos anteriores (Diamantino *et al.*, 2003) que a forma colinesterásica predominante em *D. magna* possui características intermédias entre uma verdadeira colinesterase e uma pseuocolinesterase.

Assim, após a determinação dos valores de EC<sub>50</sub> - 48 h para os dois compostos em estudo, foram definidas cinco concentrações sub-letais às quais foram submetidos os neonatos de *D. magna* a ensaios de inibição enzimática. Na figura 5 estão os resultados da determinação da actividade enzimática para a neostigmina (figura 5A) e para a piridostigmina (figura 5B), após 48 horas de exposição dos neonatos aos fármacos.

## 3. Resultados e discussão

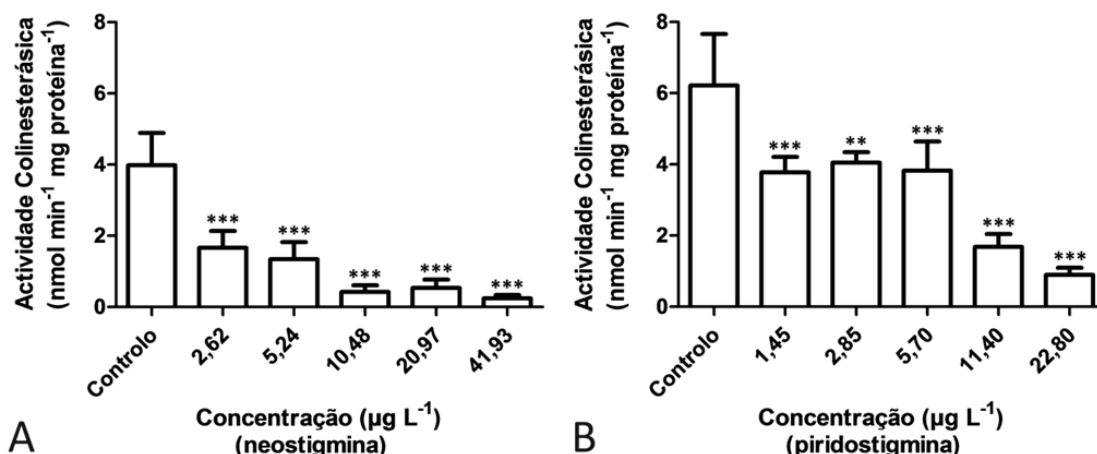


Figura 5: Dados de inibição da actividade colinesterásica após a exposição a diferentes concentrações sub-letais definidas de: A) neostigmina; B) piridostigmina; as barras correspondem à média de cinco réplicas, as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Relativamente aos resultados da actividade colinesterásica após a exposição a diferentes concentrações de neostigmina (figura 5A), podemos verificar que em todas as concentrações testadas, mesmo na mais baixa ( $2,62 \mu\text{g L}^{-1}$ ) existem diferenças significativas relativamente ao controlo ( $F_{[5;23]} = 40,98$ ;  $P < 0,0001$ ). Podemos ainda verificar a existência de uma clara relação dose-resposta, em que um aumento da dose à qual os organismos foram expostos corresponde a um aumento do grau de inibição observado. Deste modo, fica patente que o mecanismo farmacológico que justifica a toxicidade deste composto pode ser explicado, também em *D. magna*, pela inibição das colinesterases. Relativamente aos resultados da actividade colinesterásica após a exposição a diferentes concentrações de piridostigmina (figura 5B) foi possível, tal como para a neostigmina, verificar que para todas as concentrações testadas existe uma inibição significativa ( $F_{[5;23]} = 32,21$ ;  $P < 0,0001$ ) relativamente ao tratamento controlo. Tal como para o caso da neostigmina, verificou-se um aumento da inibição da actividade da colinesterase com o aumento da concentração de fármaco. Mais uma vez, tendo em conta a acção farmacológica da neostigmina, já seria de esperar a diminuição da actividade da colinesterase obtida em neonatos de *D. magna* expostos a esse composto.

De forma a se poder comparar os dois compostos ao nível da inibição enzimática foram calculados os diferentes  $IC_{50}$  - 48 h, que encontram sumarizados na tabela II.

## Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*

### 3. Resultados e discussão

Tabela II: Valores de IC<sub>50</sub> (µg L<sup>-1</sup>) e dos intervalos de confiança (entre parênteses 95% probabilidade) obtidos para *D. magna* às 48 horas de exposição a neostigmina e a piridostigmina.

IC <sub>50</sub> - 48 h Actividade ChE <i>D. magna</i> (µg L <sup>-1</sup> )	
neostigmina	piridostigmina
< 2,62	4,5
(0,08 - 3,80)	( - )

Através da análise da tabela anterior é possível verificar que para as 48 horas a neostigmina apresenta uma concentração menor relativamente à piridostigmina para levar a uma redução em 50% da actividade da colinesterase em *D. magna*. Comparativamente aos dados relativos à imobilização de neonatos para o mesmo período de tempo verificamos que há uma inversão da toxicidade apresentada pelos fármacos. Está descrito na literatura que a neostigmina é um antagonista mais potente que a piridostigmina (Booij e Drobnik, 2009), razão pela qual, esta inibição ser conseguida com uma menor concentração de neostigmina comparativamente à piridostigmina.

Relativamente às actividades enzimáticas das colinesterases descritas na bibliografia (Guilhermino *et al.*, 1996; Diamantino *et al.*, 2000; Diamantino *et al.*, 2003) estão na mesma ordem de grandeza dos obtidos neste estudo.

Comparando estes valores com valores de inibição colinesterásica IC<sub>50</sub> - 48 h para organofosforados como paratião (≈ 1,4 mg L<sup>-1</sup>), chlorpirifos (≈ 0,5 mg L<sup>-1</sup>), malatião (≈ 3 mg L<sup>-1</sup>) e acefato (≈ 17 mg L<sup>-1</sup>), carbamatos como propoxur (≈ 53 mg L<sup>-1</sup>) (Printes e Callaghan, 2004) e com outros compostos usados farmacologicamente como tacrina (≈ 1,5 mg L<sup>-1</sup>), 7 - MEOTA (≈ 0,7 mg L<sup>-1</sup>) e berberine (≈ 0,8 mg L<sup>-1</sup>) (Veselá *et al.*, 2006), verifica-se que tal como para os ensaios agudos, os compostos testados neste trabalho apresentam maior toxicidade relativamente à inibição da actividade colinesterásica em *D. magna*.

#### 3.4. Ensaio comportamental alimentar

Tal como a análise da actividade colinesterásica, a avaliação do comportamento alimentar tem sido usada com sucesso na determinação de efeitos de uma série de contaminantes, tanto no campo como em laboratório (Allen *et al.*, 1995; Barata e Baird, 2000; McWilliam e Baird, 2002; Barata *et al.*, 2007). Isto



Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
3. Resultados e discussão

deriva da ligação intrínseca entre a alimentação e o crescimento e/ou reprodução, podendo esses efeitos traduzir-se em alterações ao nível populacional (Barata e Baird, 2000).

Neste trabalho e, de acordo com o trabalho de Villarroel *et al.* (1999), foram utilizados como indicadores de alteração do comportamento alimentar as taxas de filtração e de ingestão ao fim de 5 horas. Na figura 6 são apresentados os resultados relativos a estes parâmetros para os dois fármacos em estudo, para neonatos de *D. magna*.

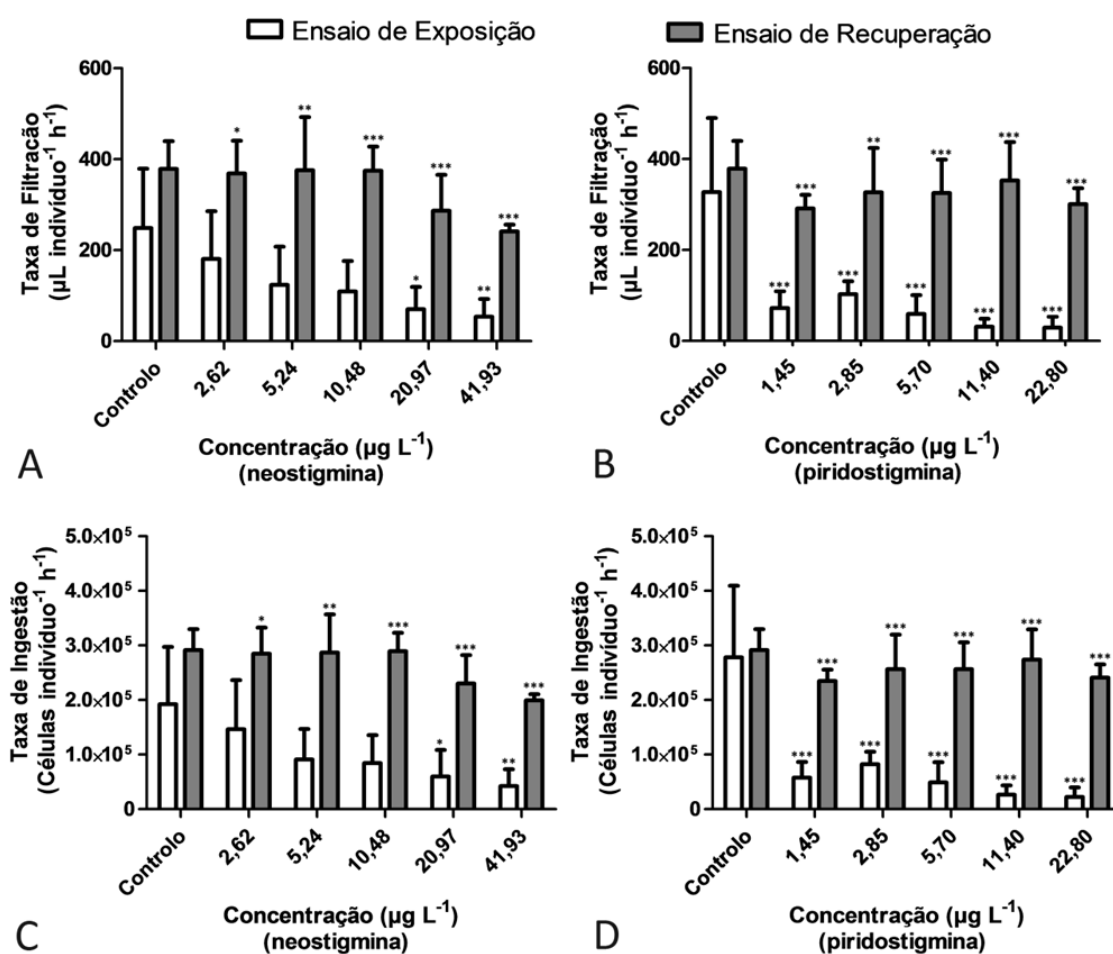


Figura 6: Dados do comportamento alimentar de *D. magna* representado pela variação das taxas de filtração (A e B) e de ingestão (C e D) de *P. subcapitata*, para diferentes concentrações sub-letais de: neostigmina (A e C) e piridostigmina (B e D). As barras a branco correspondem aos ensaios de exposição e a cinzento estão as barras correspondentes aos ensaios de recuperação de neonatos obtidos de organismos parentais expostas aos fármacos. As barras correspondem à média de cinco réplicas, as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo, para as barras brancas; nas barras cinzentas, os asteriscos indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente à barra branca correspondente.

## 3. Resultados e discussão

Através da análise dos gráficos anteriores podemos verificar que relativamente aos ensaios de exposição com a neostigmina, existem diferenças significativas relativas às taxas de filtração ( $F_{[5;24]}=3,661$ ;  $P=0,0133$ ) e de ingestão ( $F_{[5;24]}=3,383$ ;  $P=0,0187$ ) de neonatos comparativamente ao controlo, tendo-se obtido um LOEC de  $20,97 \mu\text{g L}^{-1}$ . Apesar de apenas se verificarem diferenças significativas nas duas últimas concentrações sub-letais testadas, é possível vislumbrar uma diminuição da média destas taxas com o aumento da concentração de neostigmina. Ou seja, é possível observar uma clara relação dose-resposta. Relativamente ao ensaio de exposição com piridostigmina foi também possível verificar a existência de diferenças significativas relativas às taxas de filtração ( $F_{[5;24]}=12,16$ ;  $P<0,0001$ ) e de ingestão ( $F_{[5;24]}=13,58$ ;  $P<0,0001$ ) de neonatos comparativamente ao controlo para todas as concentrações sub-letais testadas. A existência de uma relação de dose-resposta não é tão evidente quanto no ensaio envolvendo a neostigmina.

Avaliando agora os resultados obtidos relativamente às taxas de ingestão e de filtração do ensaio de recuperação, barras cinzentas na figura 6, podemos observar que a exposição de organismos parentais, às diferentes concentrações de neostigmina e de piridostigmina testadas, não apresentam efeitos ao nível do comportamento alimentar. Isto porque não existem diferenças significativas entre os neonatos nascidos de organismos parentais expostos às diferentes concentrações dos fármacos e os que nasceram no controlo ( $F_{[5;22]}=2,325$ ;  $P=0,0772$  e  $F_{[5;22]}=2,569$ ;  $P=0,0563$  para a taxa de filtração e ingestão para neostigmina respectivamente e  $F_{[5;24]}=1,136$ ;  $P=0,3688$ ;  $F_{[5;24]}=1,099$ ;  $P=0,3865$  para a taxa de filtração e ingestão para piridostigmina respectivamente). Pelo contrário, comparando para cada concentração de ambos os fármacos, através de t-testes, dos parâmetros analisados no comportamento alimentar entre os ensaios de exposição e de recuperação verifica-se que, para todos eles, excepto nos controlos, existem diferenças significativas ( $P<0,05$ ). Estes resultados sugerem que estes compostos não apresentam efeitos ao nível da oogénese e embriogénese de neonatos.

## 3. Resultados e discussão

Para as taxas de filtração e de ingestão foi ainda calculado o  $EC_{50}$  - 5 h, tabela III.

Tabela III: Valores de  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e dos intervalos de confiança (entre parênteses 95% probabilidade) obtidos para *D. magna* às 48 horas de exposição a neostigmina e a piridostigmina.

	$EC_{50}$ - 5 h Comportamento Alimentar <i>D. magna</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	neostigmina	piridostigmina
Taxa de Filtração	7,1 (5,32 - 9,00)	< 1,45 ( - )
Taxa de Ingestão	7,5 (3,18 - 13,18)	< 1,45 ( - )

Através da análise desta tabela podemos verificar que, tal como tinha sucedido para com os resultados da imobilização e contrariamente aos resultados da inibição da actividade enzimática, a piridostigmina apresenta uma maior toxicidade ao nível da alimentação de *D. magna*, comparativamente à neostigmina.

Na literatura existem relatos de estudos que avaliaram as taxas de alimentação de *Daphnia* spp. exposta a compostos com uma acção ao nível da inibição da colinesterase, para organofosforados como diazinon ( $EC_{50}$  - 5 h = 0,47  $\text{mg L}^{-1}$ ) e metil-paratíio ( $EC_{50}$  - 5 h = 0,08  $\text{ng L}^{-1}$ ), organoclorados como o endossulfão ( $EC_{50}$  - 5 h = 0,44  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1994) e nitrilos como diclobenil ( $EC_{50}$  - 4 h = 1  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Kersting, 1981). Comparativamente a estes estudos podemos verificar que apenas o metil-paratíio (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1994) é mais tóxico que os dois fármacos testados na alimentação de *Daphnia* spp.

Comparativamente aos dados obtidos para a inibição da actividade colinesterásica, estes resultados demonstram um aumento da sensibilidade relativamente à piridostigmina e uma diminuição relativamente à neostigmina. No entanto sugerem que o comportamento alimentar poderá ser condicionado pela inibição das colinesterases e consequente comprometimento da transmissão nervosa, facto este comprovado após a avaliação da actividade colinesterásica, cuja inibição foi acompanhada de um decréscimo significativo no comportamento alimentar.

### 3.5. Ensaio crónicos

De modo a se ter uma percepção dos possíveis impactos que a neostigmina e a piridostigmina possam apresentar nas populações naturais e estabelecer uma ponte com os resultados obtidos nas secções anteriores, ao nível da inibição enzimática e do comportamento alimentar, foi avaliada a toxicidade crónica destes compostos na reprodução de *D. magna*.

Na tabela IV estão sumariados os valores dos parâmetros estatísticos obtidos nos ensaios crónicos de *D. magna*.

Tabela IV: Parâmetros estatísticos com respectivos valores de NOEC e LOEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidos para *D. magna* nos ensaios crónicos com neostigmina e piridostigmina (gl = graus de liberdade).

Parâmetro	neostigmina					piridostigmina				
	F	gl	P	NOEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	F	gl	P	NOEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Fecundidade	2,212	7; 60	0,046	31,45	41,93	1,989	7; 52	0,074	5,70	11,40
Idade de maturação	2,176	7; 66	0,048	> 41,93	> 41,93	0,660	7; 56	0,705	> 22,80	> 22,80
Idade obtenção das ninhadas										
1ª ninhada	3,131	7; 58	0,007	> 41,93	> 41,93	0,851	7; 47	0,552	> 22,80	> 22,80
2ª ninhada	1,877	7; 55	0,091	> 41,93	> 41,93	1,659	7; 42	0,146	> 22,80	> 22,80
3ª ninhada	2,084	7; 53	0,061	> 41,93	> 41,93	0,727	7; 51	0,650	> 22,80	> 22,80
4ª ninhada	0,477	7; 29	0,843	> 41,93	> 41,93	0,520	7; 44	0,814	> 22,80	> 22,80
Fecundidade por ninhada										
1ª ninhada	2,495	7; 58	0,026	> 41,93	> 41,93	1,515	7; 47	0,185	> 22,80	> 22,80
2ª ninhada	1,384	7; 55	0,231	> 41,93	> 41,93	4,407	7; 42	0,001	> 22,80	> 22,80
3ª ninhada	1,385	7; 53	0,231	> 41,94	> 41,94	3,135	7; 51	0,008	17,10	20,80
4ª ninhada	0,831	7; 29	0,570	> 41,95	> 41,95	2,804	7; 44	0,017	11,40	17,10
Tamanho dos neonatos da 1ª Ninhada	2,818	7; 214	0,008	31,45	41,93	1,017	7; 184	0,420	> 22,80	> 22,80
Taxa de Crescimento Intrínseco	2,056	7; 71	0,060	31,45	41,93	1,444	7; 72	0,202	> 22,80	> 22,80
Taxa de Crescimento Somático	6,132	7; 66	< 0,0001	10,48	20,97	13,160	7; 56	< 0,0001	2,62	2,85

Nesta discussão serão apenas analisados os parâmetros que mostram diferenças significativas relativamente aos controlos. Os ensaios crónicos obedeceram aos critérios de validação estabelecidos no protocolo seguido (OCDE, 1998).

Na figura 7 estão representados os resultados relativos à fecundidade de *D. magna* nos ensaios crónicos para os dois fármacos em estudo e para as diferentes concentrações sub-letais testadas.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
3. Resultados e discussão

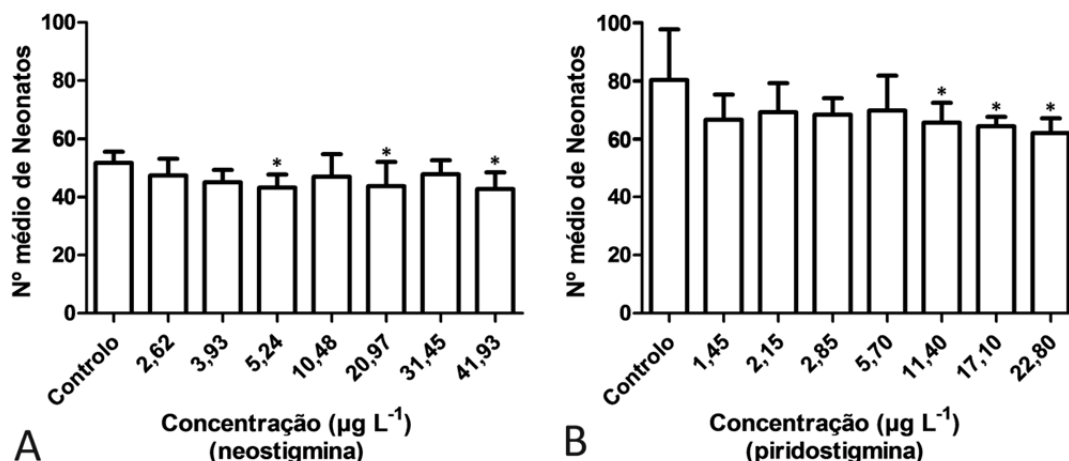


Figura 7: Fecundidade de *D. magna* sob exposição crónica a diferentes concentrações sub-letais de: A) neostigmina (apenas até à terceira ninhada); B) piridostigmina; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Com a análise destes gráficos podemos verificar diferenças significativas relativamente ao controlo, tanto para a neostigmina como para a piridostigmina. Como se pode consultar na tabela IV, para a neostigmina foi obtido um NOEC de  $31,45 \mu\text{g L}^{-1}$  e um LOEC de  $41,93 \mu\text{g L}^{-1}$ , para a piridostigmina foram obtidos os valores de  $5,70 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $11,40 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Enquanto nos dados de comportamento alimentar se verificou uma inibição significativa para todas as concentrações, na fecundidade não foi observado para nenhuma das concentrações testadas. Isto poderá indicar que apesar de haver uma diminuição da ingestão de algas, estas sejam nutricionalmente adequadas para manutenção das actividades reprodutoras normais, até certo ponto.

Podemos também verificar que esta diminuição é visível e gradual desde a primeira concentração sub-letal testada,  $2,62$  e  $1,45 \mu\text{g L}^{-1}$  neostigmina e para a piridostigmina respectivamente, apesar de não se ter observado significância estatística. Esta diminuição pode estar relacionada com uma diminuição significativa das taxas de ingestão e de filtração dos neonatos, avaliada anteriormente dado que são parâmetros que se sabem condicionam a reprodução (Lampert, 1988). Aliás está descrito que estes organismos podem adaptar a suas estratégias reprodutivas em torno da disponibilidade de alimento (Threlkeld, 1987), sendo que em alturas de escassez, os dafnídeos produzem menor descendência em favorecimento do tamanho dos neonatos (Tessier e Consolatti, 1991; Guisande e Gliwicz, 1992; Ebert, 1993; McKee e Ebert, 1996). No entanto

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
3. Resultados e discussão

apenas para a concentração de 41,93  $\mu\text{g L}^{-1}$  na exposição a neostigmina foi observado um aumento significativo do tamanho dos neonatos da primeira reprodução (figura 8).

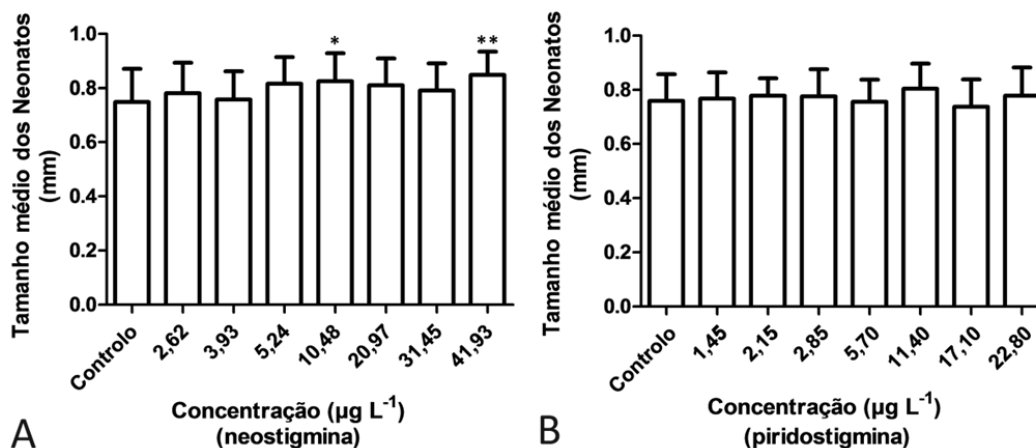


Figura 8: Tamanho dos neonatos obtidos na primeira ninhada de *D. magna* sob exposição crónica a diferentes concentrações sub-letais: A) neostigmina; B) piridostigmina; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Estudos anteriores mostraram que a neostigmina exibiu efeitos ao nível da fecundidade em concentrações acima de 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Zobov *et al.*, 2005), sendo que neste estudo, não se registaram efeitos significativos sob estas concentrações. Esta diferença poderá ser essencialmente devida aos protocolos usados para o ensaio crónico [OCDE (1998) neste estudo e ASTM (1997) no estudo de Zobov *et al.* (2005)].

Pela análise das fecundidades por ninhada, para neostigmina (figura 9) e piridostigmina (figura 10), é possível verificar que as diferenças observadas ao nível da fecundidade (figura 7) são maioritariamente devidas a uma diminuição da fecundidade em todas as ninhadas para a neostigmina, enquanto que para a piridostigmina foi mais evidente na terceira e quarta ninhadas. Contudo, as diferenças significativas para a neostigmina foram pontuais e relativamente à piridostigmina foi possível verificar que as diferenças observadas se concentram nas concentrações sub-letais mais altas testadas, evidenciando uma resposta dos organismos à exposição ao fármaco.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
3. Resultados e discussão

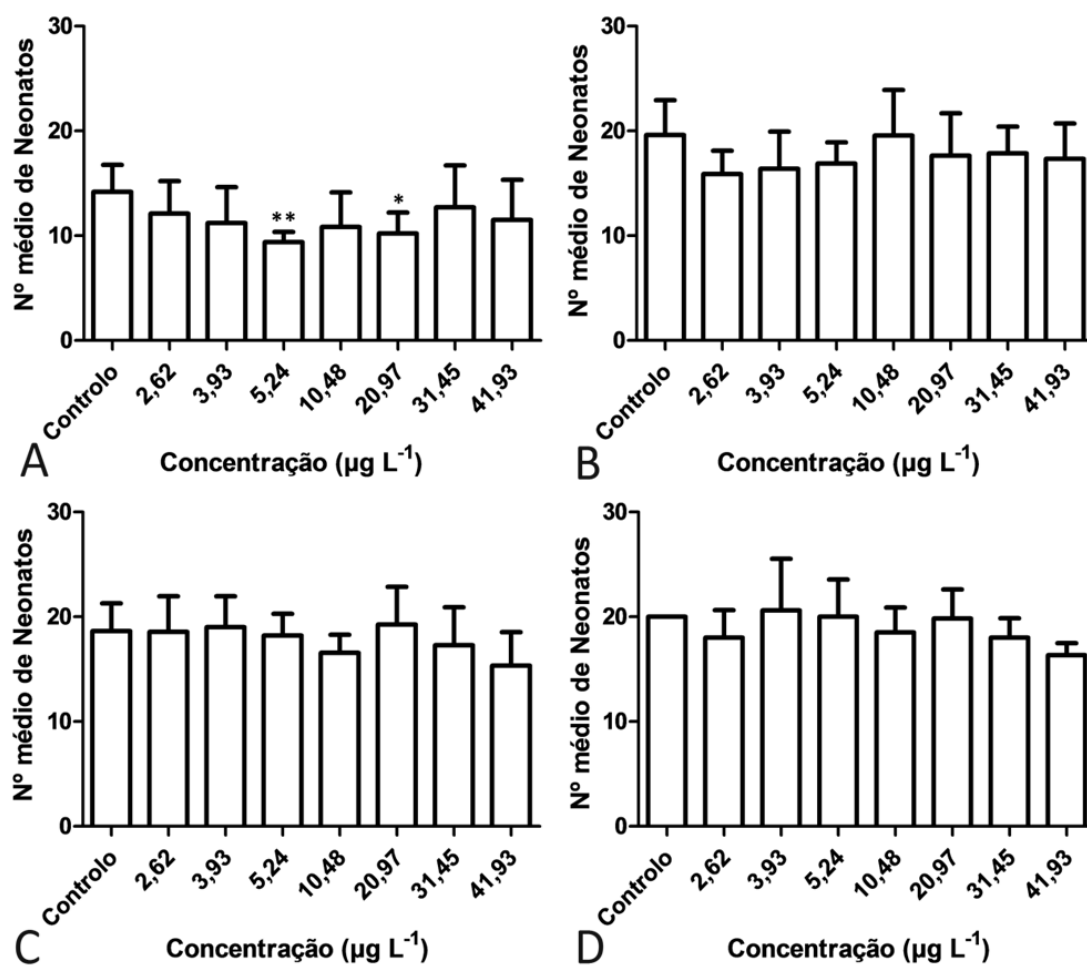


Figura 9: Fecundidade registada para as diferentes ninhadas: A) 1ª; B) 2ª; C) 3ª; D) 4ª; de *D. magna* sob exposição crónica a diferentes concentrações sub-letais de neostigmina; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
3. Resultados e discussão

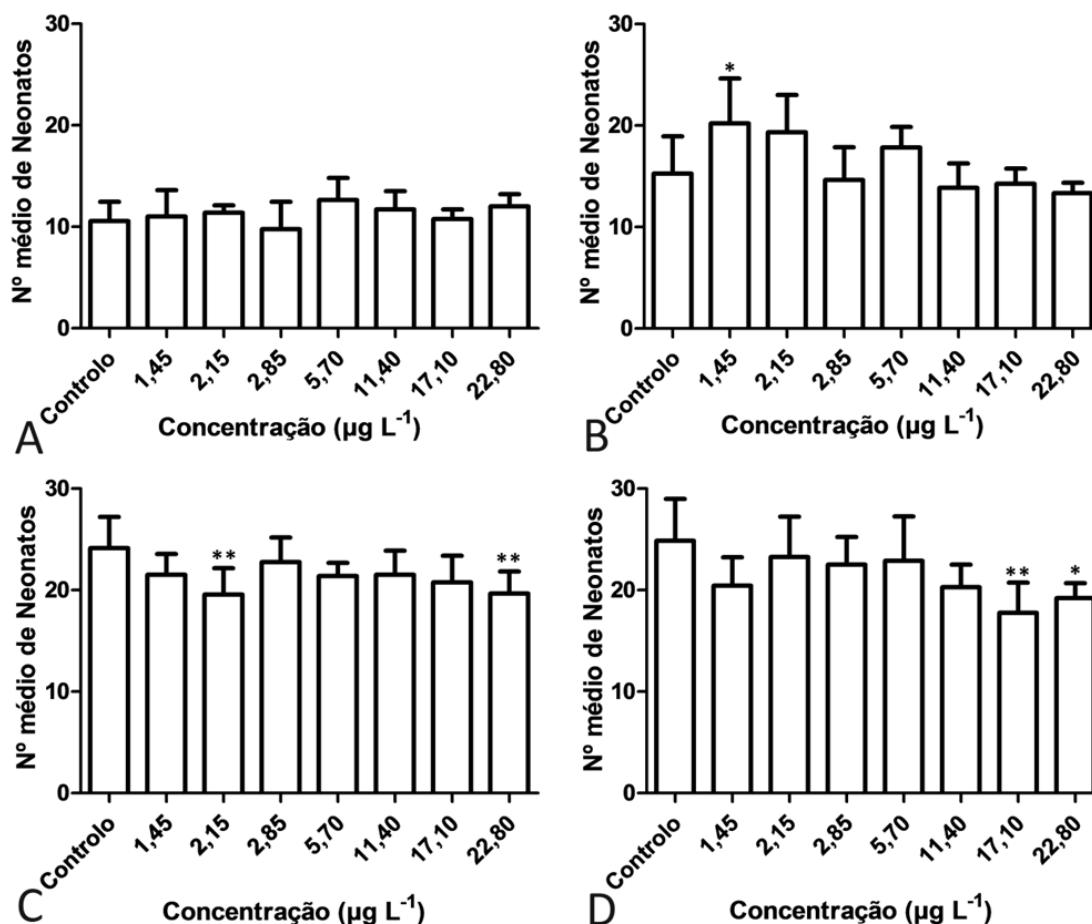


Figura 10: Fecundidade registada para as diferentes ninhadas: A) 1ª; B) 2ª; C) 3ª; D) 4ª; de *D. magna* sob exposição a diferentes concentrações sub-letais de piridostigmina; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Outro facto interessante dos resultados obtidos relativamente à piridostigmina, reside na observação de que para as primeiras duas ninhadas o seu LOEC  $> 22,80 \mu\text{g L}^{-1}$ , por ser superior às concentrações testadas, no entanto para a terceira ninhada foi obtido um LOEC de  $22,80 \mu\text{g L}^{-1}$  e para a quarta de  $17,10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estes resultados sugerem um aumento de toxicidade do composto, à medida que *D. magna* obtém as ninhadas. Uma explicação possível residiria caso de a piridostigmina fosse passível de ser bioacumulada nos tecidos de *D. magna*. No entanto esta é altamente hidrossolúvel (Budavari *et al.*, 1989; Gennaro, 1990) sendo improvável que seja um composto passível de ser bioacumulado. É possível, contudo que a exposição à piridostigmina leve a uma acumulação de um outro composto, esse sim que em conjunto com a piridostigmina afectam de forma progressiva a obtenção das ninhadas.



Posteriormente foi avaliada a taxa de crescimento intrínseca ( $r$ ), figura 11, que combina os efeitos ao nível da reprodução e da mortalidade dos organismos parentais durante os 21 dias de duração do ensaio.

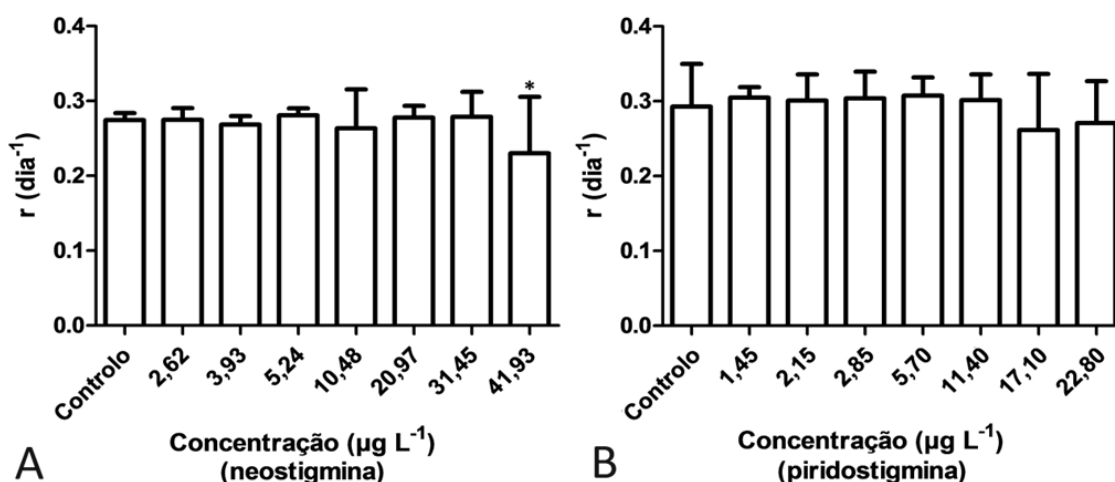


Figura 11: Taxa de crescimento intrínseca de *D. magna* sob exposição crónica a concentrações sub-letais de: A) neostigmina; B) piridostigmina; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

A análise deste parâmetro resulta do facto de integrar interacções complexas de parâmetros de história de vida e de permitir acautelar de forma mais relevante o impacto ecológico que estes fármacos possam apresentar para as populações de *D. magna* (Forbes e Calow, 1999). Foi possível observar a existência de diferenças significativas relativamente ao controlo para a neostigmina, sendo que para a piridostigmina essa situação já não acontece. É possível, no entanto verificar que existe uma diminuição da média deste parâmetro relativamente ao controlo para as duas concentrações sub-letais mais altas testadas, 17,10 e 22,80 µg L<sup>-1</sup>.

Após se ter verificado que estes dois compostos afectam de forma significativa a fecundidade em *D. magna*, a diminuição da taxa de crescimento intrínseca era esperada, na medida em que ambos os parâmetros estão interligados.

A diminuição da taxa de crescimento intrínseca observada poderá ser devida a duas situações distintas. Por um lado, a uma diminuição do crescimento somático e da taxa de reprodução, pelo que é necessário mais tempo para a formação e libertação das ninhada. Sendo os organismos parentais mais pequenos em consequência, produzem menos ovos (Hanazato *et al.*, 1998). A outra situação

## 3. Resultados e discussão

consiste num normal crescimento, maturação e data à qual se dá a obtenção das ninhadas, mas o número de ovos e neonatos são em menor número (Trubetskova e Lampert, 2004). Estes dois efeitos podem contudo agir em conjunto, afectando o *r* de uma determinada população (Trubetskova e Lampert, 2004), que aliás é o que parece estar em evidência neste estudo, dado que a exposição aos fármacos afecta o crescimento somático (figura 11) e a fecundidade dos organismos parentais, sem no entanto influenciar a idade em que é produzida cada ninhada (anexos 4 e 5 para a neostigmina e piridostigmina respectivamente). Relativamente aos valores obtidos para o controlo, estes estão de acordo com o publicado na bibliografia (Trubetskova e Lampert, 2004).

Por fim foram avaliadas as taxas de crescimento somático dos organismos parentais, figura 12.

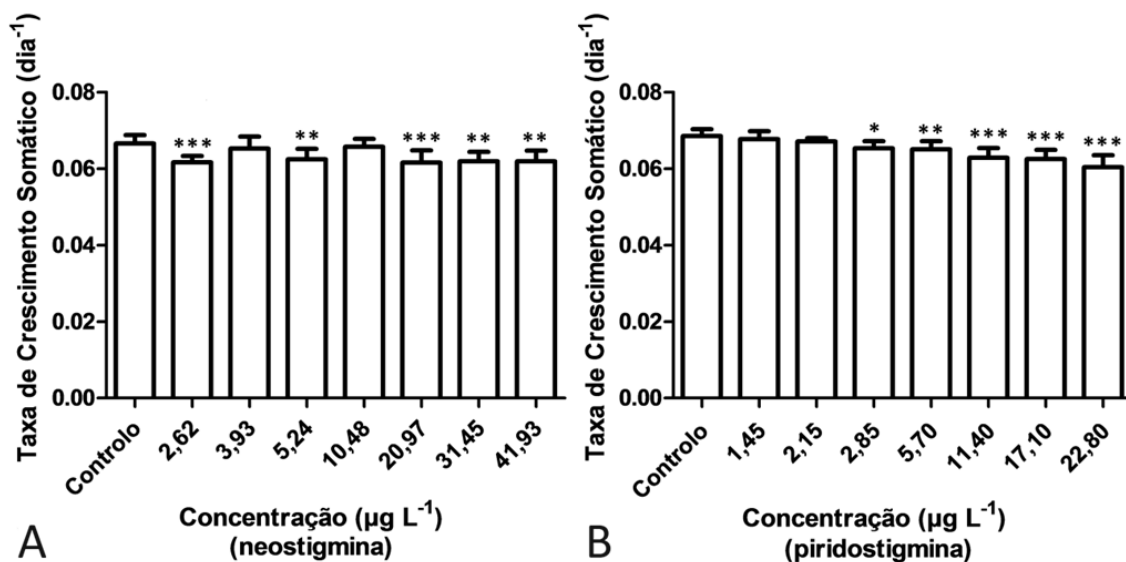


Figura 12: Taxa de crescimento somático de *D. magna* sob exposição crónica a diferentes concentrações sub-letais de: A) neostigmina; B) piridostigmina; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Pela análise dos gráficos anteriores podemos verificar que tanto a neostigmina como a piridostigmina afectam de forma significativa o crescimento dos organismos após 21 dias de exposição. Relativamente à exposição à piridostigmina (figura 12B) houve uma redução gradual do crescimento dos organismos para concentrações progressivamente superiores, tendo sido obtido um NOEC de 2,15 µg L<sup>-1</sup> e um LOEC de 2,85 µg L<sup>-1</sup>. Embora para a neostigmina também se tenha verificado o estabelecimento de uma curva dose-resposta desde as primeiras concentrações não há um padrão de significância nas respostas

### 3. Resultados e discussão

obtidas (figura 12A), tendo sido obtido um NOEC de  $10,48 \mu\text{g L}^{-1}$  e um LOEC de  $20,97 \mu\text{g L}^{-1}$ . Relativamente aos resultados dos organismos parentais expostos a neostigmina é possível verificar a existência de diferenças significativas relativamente ao controlo, a concentrações inferiores ao NOEC obtido,  $10,48 \mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto é possível que isto se deva a situações pontuais, não sendo resultado directo da acção do fármaco em questão.

De uma maneira geral os ensaios crónicos demonstraram que os fármacos em estudo têm influência significativa ao nível da reprodução de *D. magna*, nomeadamente ao nível da fecundidade, do tamanho dos neonatos da primeira ninhada, das taxas de crescimento intrínsecas e das taxas de crescimento somático a concentrações relativamente baixas, na ordem dos  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que existe na literatura um estudo (Zobov *et al.*, 2005) que reporta para a neostigmina a existência de efeitos a concentrações inferiores às obtidas neste trabalho,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4. Considerações finais/conclusões

Em resultado das actividades humanas várias toneladas de compostos são directa ou indirectamente libertadas no ambiente. De entre estes compostos, os fármacos estão a receber uma maior atenção da comunidade científica dada a sua ocorrência no ambiente aquático ser hoje em dia um facto adquirido (Daughton e Ternes, 1999). À medida que o consumo deste tipo de compostos aumenta aliado à introdução no mercado de novos fármacos poderão atingir-se valores no ambiente capazes de levar a alterações significativas das comunidades que directamente com estes contactam (Daughton e Ternes, 1999; Ginebreda et al., 2010).

A avaliação de risco de compostos no ambiente já é realizada desde os anos 70, recorrendo a organismos que se sabem serem capazes de responder a diferentes graus de contaminação (Jonczyk e Gilron, 2005). Apesar de serem estudos realizados em laboratório sob condições óptimas, são um meio importante para a extrapolação indirecta dos efeitos que são passíveis de causar no ambiente.

*D. magna*, como já foi referido anteriormente, é um dos exemplos de organismos muito utilizados em ecotoxicologia aquática, existindo na literatura estudos descrevendo efeitos após exposições a diversos compostos. De entre o grupo dos compostos farmacêuticos, diazepam (Lilius et al., 1993; Calleja et al., 1995), ibuprofeno (Knol 1995), propranolol (Lilius et al., 1993; Calleja et al., 1995) são exemplos de compostos em que foi avaliada a sua toxicidade em *D. magna*.

Este estudo consistiu numa abordagem inicial para avaliar efeitos da neostigmina e piridostigmina a vários níveis de organização, nomeadamente ao sub-celular (com a determinação da actividade enzimática de colinesterases) e do indivíduo (com a avaliação das taxas de ingestão, filtração e da reprodução).

Com este trabalho foi possível obter valores de  $EC_{50}$  - 48 h de cerca de 167,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e de cerca de 91,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a piridostigmina. Relativamente ao ensaio de actividade enzimática foi determinado um  $IC_{50}$  - 48 h de < 2,62 e 4,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e piridostigmina respectivamente. Ao nível do comportamento alimentar os  $EC_{50}$  - 5 h foram para as taxas de filtração e de ingestão respectivamente 7,1 e 7,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para neostigmina e < 1,45  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a piridostigmina. Foi possível também concluir que estes compostos, nas concentrações sub-letais testadas, não aparentam causar efeitos deletérios ao nível

#### 4. Considerações finais/conclusões

da oogénese e da embriogénese. Relativamente aos ensaios crónicos de avaliação de efeitos ao nível da reprodução foi possível concluir que ao nível da fecundidade se obteve um LOEC de 41,93 e de 11,40  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e piridostigmina respectivamente. Relativamente ao tamanho dos neonatos da primeira ninhada foi obtido um LOEC de 41,93  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina, ao nível das taxas de crescimento intrínsecas foi obtido um LOEC de 41,93  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina sendo que para a piridostigmina se verificou uma diminuição deste parâmetro nas duas concentrações mais altas testadas (17,10 e 22,80  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Por fim, ao nível do crescimento somático foi onde se obtiveram efeitos a menores concentrações, uma vez que os LOEC foram 20,97 e 2,85  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a neostigmina e piridostigmina respectivamente.

Os resultados apresentados na secção anterior demonstraram que estes compostos são capazes de afectar o normal funcionamento dos parâmetros avaliados. Os resultados obtidos parecem apontar que exista uma interligação entre os diferentes parâmetros avaliados na medida em que o decréscimo significativo na actividade colinesterásica foi acompanhado por um decréscimo significativo do comportamento alimentar, sob a forma de taxas de ingestão e de filtração e este por sua vez foi acompanhado por um decréscimo significativo ao nível da fecundidade, no tamanho dos neonatos da primeira ninhada, das taxas de crescimento intrínsecas e do crescimento somático nos ensaios crónicos. Estes resultados sugerem que a inibição de uma enzima envolvida na cessação do impulso nervoso ao nível central e muscular, colinesterase, pode afectar o comportamento alimentar que por sua vez condiciona a condição dos organismos, com consequências ao nível populacional.

Este trabalho foi desenvolvido expondo *D. magna* a concentrações baixas, na ordem dos  $\mu\text{g L}^{-1}$  de neostigmina e de piridostigmina, o torna os resultados dos parâmetros avaliados ecologicamente relevantes. Na tabela V estão sumarizados os valores de  $\text{EC}_{50}$  e  $\text{IC}_{50}$  calculados com base nos resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados com *D. magna*, para a neostigmina e piridostigmina.

## 4. Considerações finais/conclusões

Tabela V: Valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> calculados a partir dos resultados dos diferentes ensaios realizados expondo neonatos de *D. magna* a diferentes concentrações de neostigmina e piridostigmina.

Parâmetro	neostigmina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	piridostigmina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Imobilização	167,7	91,3
EC <sub>50</sub> - 48 h	(147,28 - 194,44)	(82,61 - 101,39)
Actividade ChE	< 2,62	4,5
IC <sub>50</sub> - 48 h	(0,08 - 3,80)	(-)
Taxa de Filtração	7,1	< 1,45
EC <sub>50</sub> - 5 h	(5,32 - 9,00)	(-)
Taxa de Ingestão	7,5	< 1,45
EC <sub>50</sub> - 5 h	(3,18 - 13,18)	(-)
Fecundidade	> 41,93	> 22,80
EC <sub>50</sub> - 21 d	(-)	(-)

Os dados acerca da presença de neostigmina e piridostigmina no ambiente são escassos. Existe apenas referência de um estudo, no qual foi avaliada a presença no rio Lee, no Reino Unido de um conjunto de fármacos, entre eles a piridostigmina -  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$  (Richardson e Bowron, 1985). Assim, como se pode verificar na tabela V, relativamente à inibição da actividade colinesterásica e ao nível da reprodução de *D. magna* não é expectável que estes valores possam induzir efeitos deletérios significativos. No entanto, relativamente ao comportamento alimentar, pelo facto de se ter obtido um valor de EC<sub>50</sub> - 5 h para as taxas de ingestão e de filtração de  $< 1,45 \mu\text{g L}^{-1}$ , é possível e até provável que a exposição de *D. magna* a esses níveis ambientais de piridostigmina possa ser um risco para esses parâmetros.

Outro factor a ter em conta, consiste no facto de os compostos não surgirem no em cenários reais de exposição de forma isolada, mas sim num conjunto de contaminantes (Escher *et al.*, 2005). Tal como a neostigmina e a piridostigmina, inúmeros compostos como insecticidas organofosforados e carbamatos caso estejam presentes no ambiente poderão exercer efeitos potencialmente mais tóxicos para estes organismos. Assim, quando combinados, os compostos podem levar a uma acumulação de efeitos que podem ser fatais, apesar de individualmente não condicionarem aparentemente, a sobrevivência dos organismos.

Assim é essencial aumentar o conhecimento sobre este tipo de compostos, com uma caracterização da presença/ausência destes compostos nos ecossistemas

#### 4. Considerações finais/conclusões

ambientais e antecipar e estudar possíveis cenários de exposição real de maneira a se poder ter uma ideia do potencial perigo para as comunidades que vivem nos diferentes ecossistemas.

Como perspectivas futuras seria interessante fazer a caracterização do potencial risco que estes compostos possam apresentar para outras espécies, assim como explorar de forma mais exaustiva certas respostas observadas, por exemplo procurar descobrir o porquê de a toxicidade da piridostigmina ser superior de ninhada para ninhada.

## 5. Bibliografia

- Abrantes, N., Antunes, S. C., Pereira, M. J. e Gonçalves, F. 2006. Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecologica*, **29(1)**:54-64.
- Abu-Qare, A. W. e Abou-Donia, M. B. 2002. Binding of pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide and permethrin, alone and in combinations, to human serum albumin. *Archives of toxicology*, **76(4)**:203-208.
- Albuquerque, E. X., Rash, J. E., Mayer, R. F. e Satterfield, J. R. 1976. An electrophysiological and morphological study of the neuromuscular junction in patients with myasthenia gravis. *Experimental Neurology*, **51(3)**:536-563.
- Alekseev, V. R. e Lajus, D. L. 2009. Maternal and direct effects of natural-like changes of photoperiod and food condition manipulation on life history parameters in *Daphnia*. *Aquatic Ecology*, **43(2)**:415-421.
- Allen, Y., Calow, P. e Baird, D.J. 1995. A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14(9)**:1625-1630.
- Al-Rifai, J. H., Gabelish, C. L. e Schäfer, A. I. 2007. Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere*, **69(5)**:803-815.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1980. Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians, Report E-729-80. ASTM, Philadelphia.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1997. Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests, NTIS/ASTM-E-1193-97, ASTM, Philadelphia.
- Andersen, S. R. e Sandaa, R. A. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **60(3)**:908-912.
- Aquilonius, S. M. e Hartvig, P. 1986. Clinical pharmacokinetics of cholinesterase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*, **11(10)**:236-249.



- Arnér, M. e Koivisto, S. 1993. Effects of salinity on metabolism and life history characteristics of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia*, **259(2)**:69-77.
- Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. e Soares, A. M. V. M. 1989. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, **188/189(1)**:403-406.
- Baird, D. J., Soares, A. M. V. M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M. e Calow, P. 1988. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. Proceedings, 1st European Conference on Ecotoxicology, Copenhagen, Denmark, 144-148.
- Barata, C. A. e Baird, D. J. 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, **48(2-3)**:195-209.
- Barata, C. A., Baird, D. J., Soares, A. M. V. M., Guilhermino, L. 2001. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49(2)**:155-163.
- Barata, C., Damásio, J. B., López, M. A., Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D., Carmen, M. e Raldúa, D. 2007. Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26(2)**:370-379.
- Barata, C., Markich, S. J., Baird, D. J. e Soares, A. M. V. M. 2002. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, **61(3-4)**:143-154.
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T. e Barber, L. B. 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Science of the Total Environment*, **402(2-3)**:192-200.
- Berberovic, R., Bikar, K. e Geller, W. 1990. Seasonal variability of the embryonic development time of three planktonic crustaceans: dependence on temperature, adult size, and egg weight. *Hydrobiologia*, **203(3)**:127-136.
- Bocquené, G., Galgani, F. e Truquet, P. 1990. Characterization and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, **30(2)**: 75-89.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
5. Bibliografia

- Booij, L. H. D. J. e Drobnik, L. 2009. Neostigmine as a reversal agent: effects and side-effects. *Anestezjologia i Ratownictwo*, **3**:304-335.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**:248-254.
- Breyer-Pfaff, U., Maier, U., Binkmann, A. M. e Schumm, F. 1985. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **37(5)**:495-501.
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. e Heckelman, P. E. 1989. The Merck Index, 11<sup>a</sup> Edição., Rahway, NJ, Merck & Co., Inc.
- Burns, C. W. 1968. The relationship between body size of filter-feeding Cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnology and Oceanography*, **13(4)**:675-678.
- Burns, C. W. 1969. Relation between filtering rate, temperature and body size in four species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **14(5)**:693-700.
- Burns, C. W. 2000. Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, **43(1)**:19-29.
- Buser, H. R., Poiger, T. e Muller, M. D. 1999. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science and Technology*, **33(15)**:2529-2535.
- Calleja, M. C., Persoone, G. e Geladi, P. 1993. The predictive potential of a battery of ecotoxicological tests for human acute toxicity, as evaluated with the first 50 ME1C chemicals. *ALTA - Alternatives to Laboratory Animals*, **21(3)**:330-349.
- Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K. e Kühler, T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? *Science of the Total Environment*, **364(1-3)**:67-87.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. e Zuccato, E. 2006. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environmental Science and Technology*, **40(1)**:357-363.
- Castro, B. B. e Gonçalves, F. 2007. Seasonal dynamics of the crustacean zooplankton of a shallow eutrophic lake from the Mediterranean region. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie*, **169(3)**:189-202.

- Cleuvers, M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, **142(3)**:185-194.
- Cleuvers, M. 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **59(3)**:309-15.
- Conti-Fine, B. M., Milani, M. e Kaminski, H. J. 2006. Myasthenia gravis: past, present, and future. *The Journal of Clinical Investigation*, **116(11)**:2843-2854.
- Crane, M., Watts, C. e Boucard, T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, **367(1)**:23-41.
- Daughton, C. G. e Ternes, T. A. 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*, **107(Suplemento 6)**:907-938.
- Daughton, C.G. 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rational for and avenues toward a green pharmacy. *Environ Health Perspect*, **111(5)**: 757-774.
- Day, K. e Kaushik, N. K. 1987. An assessment of the chronic toxicity of the synthetic pyrethroid, fenvalerate, to *Daphnia galeata mendotae*, using life tables. *Environmental Pollution*, **44(1)**:13-26.
- Deyi, X., Linxiu, W. e Shuqiu, P. 1981. The inhibition and protection of cholinesterase by physostigmine and pyridostigmine against soman poisoning in vivo. *Fundamental and Applied Toxicology*, **1(2)**:217-221.
- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M. e Guilhermino, L. 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and their inhibition by zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **71(2)**:219-225.
- Dodson, S. I. e Frey, D. 1991. Cladocera and other Branchiopoda. Em: Thorpe, J. H. e Covich, A. P. Ecology and Classification of North American freshwater Invertebrates. Academic Press, New York, 723-786.
- Dodson, S. I. e Hanazato, T. 1995. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic-chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, **103(Suplemento 4)**:7-11.

- Ebert, D. 1993. The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: the influence of genetic, environmental and maternal effects. *Archiv fur Hydrobiologie*, **4(Suplemento 90)**:453-473.
- Ebert, D. 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
- Ellis, J. B. 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environmental Pollution*, **144(1)**:184-189.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. e Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**:88-95.
- EMA European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Draft CPMP Discussion Paper on environmental risk assessment of Non-genetically Modified Organisms (Non-GMO) containing medicinal products for human use 2001, CMP/SWP/4447/00 Final; EMA London.
- Engel, A. G. e Santa, T. 1971. Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **183**:46-63.
- EPA Environmental Protection Agency. 1989. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, EPA, 600/4/001.
- Erb, W. 18979. Zur casuistic der bulbaren lahmungen. (3) Ueber einen neuen, wahrscheinlich bulbaren symptomencoplex. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, **9**:336-350.
- Escher, B. I. e Hermens, J. L. M. 2002. Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science & Technology*, **36(20)**:4201-4217.
- Escher, B. I., Bramaz, N., Eggen, R. I. L. e Richter, M. 2005. In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environmental Science & Technology*, **39(9)**:3090-3100.
- Estatística do Medicamento, Infarmed, 2009.
- Eto, M. 1974. Organophosphorus Pesticides. Organic and Biological Chemistry. CRC Press, Ohio.

- European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001. *Toxicology Letters*, **131(1-2)**:137-143.
- Fent, K., Weston, A. A. e Caminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, **76(2)**:122-159.
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M. D. e Andreu-Moliner, E. 1994. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **27(1)**:82-89.
- Fick, J., Lindberg, R. H., Tysklind, M. e Larsson, D. G. J. 2010. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **58(3)**:516-523.
- Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. 3ª Edição. Cambridge University Press, Cambridge.
- Flacke, W. 1973. Treatment of myasthenia gravis. *The New England Journal of Medicine*, **288**:27-31.
- Flaherty, C. M. e Dodson, S. I. 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, Flury, M. e Papritz, A. 1993. Bromide in the natural environment: occurrence and toxicity. *Journal of Environmental Quality*, **22(4)**:747-758.
- Forbes, V. E. e Calow, P. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18(7)**:1544-1556.
- Gauld, D. T. 1951. The grazing rate of planktonic copepods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **29(3)**:695-706.
- Geller, W. 1975. Die Nahrungsaufnahme von *Daphnia pulex* in Abhängigkeit von der Futterkonzentration, der Temperatur, der Körpergrösse und dem Hungerzustand der Tiere. *Archiv für Hydrobiologie*, **48(Suplemento)**:47-107.
- Gennaro, A. R. 1990. Remington's Pharmaceutical Sciences. 18ª Edição, Easton, PA, Mack Publishing Co.
- Gill, T. S., Tewari, H. e Pande, J. 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **97(2)**:287-292.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., López de Alda, M., Brix, R., López-Doval, J. e Barceló, D. 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate

- diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, **36(2)**:153-162.
- Goldflam, S. 1893. Ueber einen sheinbar heibaren bulbarparalytischen symptomcomplex mit betheiligung der extremitaten. *Dtsch Z Nervenhe*, **4**:312-352.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. e Kuby, J. 2003. Immunology. 5ª Edição. W. H. Freeman, Nova York.
- growth, and reproduction. *Chemosphere*, **61(2)**:200-207.
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M. C. e Soares, A. M. V. M. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphates and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, **3(2)**:157-163.
- Guilhermino, L., Lacerda, M. N., Nogueira, A. J. A. e Soares, A. M. V. M. 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Science of the Total Environment*, **247(2-3)**:137-141.
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P. e Soares, A. M. V. M. 1996b. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **32(4)**:727-738.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A. P. e Soares, A. M. V. M. 1996a. Acetylcholinesterase activity in juvenile *Daphnia magna* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57(6)**:979-985.
- Guisande, C. e Gliwicz, Z. M. 1992. Egg size and clutch size in two *Daphnia* species grown at different food levels. *Journal of Plankton Research*, **14(7)**:997-1007.
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O. e Larsson, D. G. J. 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental Science & Technology*, **42(15)**:5807-5813.
- Gyllström, M. e Hansson, L. A. 2004. Dormancy in fresh water zooplankton: induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Science*, **66(3)**:274-295.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C. e Jørgensen, S. E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, **36(2)**:357-393.

- Hanazato, T. 1998. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere*, **36(8)**:1903-1909.
- Hart, B. T., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McMahon, A., Meredith, C. e Swadling, K. 1991. A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota. *Hydrobiologia*, **210(1-2)**:105-144.
- Heberer, T. e Stan, H. J. 1997. Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **67(1-4)**:113-124
- Hebert, P. D. N. 1987. Genetics of *Daphnia*. Em: Peters, R. H. e de Bernardi, R. *Daphnia*, volume 45. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, *Pallanza*, 245-284.
- Hebert, P. D. N., Remigio, E. A., Colbourne, J. K., Taylor, D. J. e Wilson, C. C. 2002. Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans. *Evolution*, **56(5)**:909-926.
- Heisey, D. e Porter, K. G. 1977. The effect of ambient oxygen concentration on filtering and respiration rates of *Daphnia galeata mendotae* and *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, **22(5)**:839-845.
- Hennis, P. J., Cronnelly, M., Sharma, M., Fisher, D. M. e Miller, R. D. 1984. Metabolites of neostigmine and pyridostigmine do not contribute to antagonism of neuromuscular blockade in the dog. *Anesthesiology*, **61(5)**:534-539.
- Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A. R. e Barceló, D. 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, **69(2)**:334-342.
- Heyl, W. C., Harris, L. W. e Stitcher, D. L. 1980. Effects of carbamates on whole blood cholinesterase activity: chemical protection against soman. *Drug and Chemical Toxicology*, **3(3)**:319-332.
- Hirsch, R., Ternes, T. A., Haberer, K. e Kratz, K. L. 1996. Nachweis von Betablockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt, *Vom Wasser*, **87**:263-274.
- Howard, J. F. 2008. Myasthenia gravis a manual for the health care provider. 1ª Edição, St. Paul, Myasthenia Gravis Foundation of America.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
5. Bibliografia

- James, M. O. 1986. Overview of in vivo metabolism of drugs by aquatic species. *Veterinary & Human Toxicology*, **28(1)**:2-8.
- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M. e Barceló, D. 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, **45(3)**:1165-1176.
- Jolly, F. 1895. Pseudoparalysis myasthenica. *Neurologisches Centralblatt*, **14**:34-36.
- Jonczyk, E. e Gilron, G. 2005. Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia* sp. Em: Blaise, C. e Férard, J. F. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations, volume 1, 337-393. *Springer*, Printed in the Netherlands.
- Kaminski, H. J. 2009. Myasthenia Gravis and Related Disorders. Humana Press, 2ª Edição.
- Keeler, J. R., Hurst, C. G. e Dunn, M. A. 1991. Pyridostigmine used as a nerve agent preteratment under wartime conditions. *Journal of the American Medical Association*, 266(5):693-695.
- Kersting, K. H. Van der Horning. 1981. Effect of the herbicide dichlobenil on the feeding and filtering rate of *Daphnia magna*. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, **21**:1135-1140.
- Knoll, BASF. pharma safety data sheet Ibuprofen, Issue/revision date 6/4/95. Knoll Pharmaceuticals, Nottingham, NG2 3AA England.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. e Buxton, H. T. 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6):1202-1211.
- Krause-Dellin, D. e Steinberg, C. 1986. Cladoceran remains as indicators of lake acidification. *Hydrobiologia*, **143(1)**:129-134.
- Kümmerer, K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, **45(6-7)**:957-969.
- Lampert, W. 1988. The relative importance of food limitation and predation in the seasonal cycle of two *Daphnia* species. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **23**:713-718.



- Lampert, W. 1993. Ultimate causes of diel vertical migration of zooplankton: new evidence for the predator-avoidance hypothesis. *Archiv für Hydrobiologie Beiheft/Ergebnisse der Limnologie*, **39**:79-88.
- Lampert, W. 2006. *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology*, 54(4):607-620.
- Li, S. e Tan, Y. 2011. Hormetic response of cholinesterase from *Daphnia magna* in chronic exposure to triazophos and chlorpyrifos. *Journal of Environmental Sciences*, **23(5)**:852-859.
- Lilius, H., Hastbacka, T. e Isomaa, B. 1995. A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14(12)**:2085-2088.
- Lilius, H., Isomaa, B. e Holmström, T. 1994. A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **30(1)**:47-60.
- López-Serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrovic, M. e Barceló, D. 2010. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Talanta*, **83(2)**:410-424.
- Lynch, 1983. Ecological genetics of *Daphnia pulex*. *Evolution*, **37(2)**:358-374.
- Maquilonius, S. M., Eckernas, S. A., Hartvig, P., Lindström, B., Osterman, P. O. e Stalberg, E. 1983. Clinical pharmacology of pyridostigmine and neostigmine in patients with myasthenia gravis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **46(10)**:929-935.
- Marques, C. R., Abrantes, N. e Gonçalves, F. 2004. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid. *Environmental Toxicology*, **19(5)**:518-526.
- Martin-Creuzburg, D., Bec, A. e von Elert, E. 2006. Supplementation with sterols improves food quality of a ciliate for *Daphnia magna*. *Protist*, 157(4):477-486.
- Martin-Creuzburg, D., von Elert, E. e Hoffmann, K. H. 2008. Nutritional constraints at the cyanobacteria-*Daphnia magna* interface: the role of sterols. *Limnology and Oceanography*, **53(2)**:456-468.

- McKee, D. e Ebert, D. 1996. The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype on offspring size in *Daphnia magna*. *Oecologia*, **107(2)**:189-196.
- McWilliam, R. A. e Baird, D. J. 2002. Post-exposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **21(6)**:1198-1205.
- Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L. L. e Boyce, M. S. 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology*, **67(5)**:1156-1166.
- Miranda, C. D. e Zemelman, R. 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, **42(11)**:1096-1102.
- Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. M. e Wegener, H. C. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104, *The New England Journal of Medicine*, **341**:1420-1425.
- Moore, J. W. 1980. Zooplankton, and related phytoplankton cycles, in a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, **74(2)**:99-104.
- Müller-Navarra, D. 1995. Evidence that a highly unsaturated fatty acid limit *Daphnia* growth in nature. *Archiv für Hydrobiologie*, **132()**:297-307.
- Münzinger, A. e Monicelli, F. 1992. Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **23(3-4)**:203-216.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **61(3)**:413-419.
- OCDE. 1996. *Daphnia magna* Reproduction Test. Guidelines for Testing of Chemicals, nº 202, Part II, Organization for Economic Cooperation and Development.
- OCDE. 2000. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test. Guidelines for Testing of Chemicals, nº 202, Organization for Economic Cooperation and Development.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1984. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test Method 202.

- Oppennheim, H. 1887. Ueber einen fall von chronisher progressive bulbar paralyse ohne anatomischen befund. *Virchows Arch fur Pathologische Anatomie and Physiologie*, **180**:522-530.
- Pascoe, D., Karntanut, W. e Muller, C.T. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, **51(6)**:521-528.
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W. e Fancey, L. L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, **32(2)**:225-231.
- Peakall, D. 1992. Animal biomarkers as pollution indicators, 1ª Edição. Chapman & Hall, London.
- Peñalva-Arana, D. C., Moore, P. A., Feinberg, B. A., DeWall, J. e Strickler, J. R. 2007. Studying *Daphnia* feeding behavior as a black box: a novel electrochemical approach. *Hydrobiologia*, **594**:153-163.
- Pennak. 1989. Freshwater Invertebrates of United States. 3ª Edição. Protozoa to Mollusca, John Wiley & Sons, New York, NY.
- Pereira, J. L., Marques, C. R. e Gonçalves, F. 2004. Allometric relations for *Ceriodaphnia* spp. and *Daphnia* spp. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, **40(1)**:11-14.
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F. e Zuccato, E. 2008. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences*, **102(1)**:129-37.
- Porter, K. G., Gerritsen, J. e Orcutt, J. D., Jr. 1982. The effect of food concentration on swimming patterns, feeding behavior, ingestion, assimilation, and respiration in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **27(5)**:935-949.
- Preuss, T. G., Hammers-Wirtz, M., Hommen, U., Rubach, M. N. e Ratte, H. T. 2009. Development and validation of an individual based *Daphnia magna* population model: The influence of crowding on population dynamics. *Ecological Modelling*, **220(3)**:310-329.
- Printes, L. B. e Callaghan, A. 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23(5)**:1241-1247.

- Printes, L. B. e Callaghan, A. 2006. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22(9)**:2042-2047.
- Randall, L. O. e Lehmann, G. 1950. Pharmacological properties of some neostigmina analogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **99(1)**:16-32.
- Reddersen, K., Heberer, T., Dünnebier, U. 2002. Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere*, **49(6)**:539-544.
- Richards, S. M., Wilson, C. J., Johnson, D. J., Castle, D. M., Lam, M., Mabury, S. A., Sibley, P. K. e Solomon, K. R. 2004. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **23(4)**:1035-42.
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner T. e Kohl, J. G. 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65(2)**:737-739.
- Sapolsky, R.M. 1998. The stress of Gulf War Syndrome. *Nature*, **393(6683)**:308-309.
- Scholten, M., Foekema, E., Dokkum, H. V., Kaag, N. e Jak, R. 2005. Eutrophication management and ecotoxicology. *Springer Berlin Heidelberg New York*.
- Schwabe, U. e Paffrath, D. (eds.): Arzneiverordnungsreport 2001, Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- Seiler, J. P. 2002. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology-can the two be connected? *Toxicology Letters*, **131(1-2)**: 105-115.
- Soares, A. M. V. M. 1989. Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Caldocera), implications for ecotoxicology. Tese de Doutoramento, Departamento das ciências dos animais e plantas, Universidade de Sheffield, Sheffield, Reino Unido.
- Sobral, O. M. F. 1997. Ecotoxicidade de efluentes de indústrias de pasta de papel resultantes de diferentes processos de pré-branqueamento, Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Somani, S. M., Roberts, J. B. e Wilson, A. 1972 Pyridostigmine metabolism in man. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **13(3)**:393-399.

- Somani, S. M., Roberts, J. B., Thomas, B. H. e Wilson, A. 1970. Isolation and characterisation of metabolites of neostigmine from rat urine. *European Journal of Pharmacology*, **12(1)**:114-119.
- Song, X., Tian, H., Bressler, J., Pruett, S. e Pope, C. 2002. Acute and repeated restraint stress have little effect on pyridostigmine toxicity or brain regional cholinesterase inhibition in rats. *Toxicological Sciences*, **69(1)**:157-164.
- Starkweather, P. L. 1978. Diel variation in feeding behavior of *Daphnia pulex*. Influences of food density and nutritional history on mandibular activity. *Limnology and Oceanography*, **23(2)**:307-317.
- Starkweather, P. L. 1983. Daily patterns of feeding behavior in *Daphnia* and related microcrustacea: implications for cladoceran autecology and the zooplankton community. *Hydrobiologia*, **100(1)**:203-221.
- Starkweather, P. L. 1983. Daily patterns of feeding behavior in *Daphnia* and related microcrustacea: implications for cladoceran autecology and the zooplankton community. *Hydrobiologia*, **100(1)**:203-221.
- Stein, J. R. 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge. University Press, London, Reino Unido, 7-24.
- Straile, D. e Geller, W. 1998. The response of *Daphnia* to changes in trophic status and weather patterns: a case study from Lake Constance. *ICES Journal of Marine Science*, **55(4)**:775-782.
- Straub, J. O. 2002. Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001. *Toxicology Letters*, **131(1-2)**:137-143.
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H. e Liess, M. 2000. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19(6)**:1607-1615.
- Taylor, G. 2002. The influence of particle sorption on the bioavailability of contaminants to *Daphnia magna*. Tese de Doutoramento. Instituto do Ambiente e Vida. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Taylor, G., Baird, D. J. e Soares, A. M. V. M. 1998. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17(3)**:412-419.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
5. Bibliografia

- Ternes, T. A., Kreckel, P. e Mueller, J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment* **225(1-2)**:91-99.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D. e Servos, M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, **225(1-2)**:81-90.
- Tessier, A. J. e Consolatti, N. L. 1991. Resource quantity and offspring quality in *Daphnia*. *Ecology*, **72(2)**:468-478.
- Threlkeld, S. T. 1987. *Daphnia* life history strategies and resource allocation patterns. In: Peters, R. H. e de Bernardi, R. (Eds.), *Daphnia. Meorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, **45**:353-366.
- Tiwari, D. C., Jain, R. e Sharma, S. 2008. Electrochemical behaviour of pyridostigmine bromide-an anticholinergic drug at polyaniline/polypyrrole composite polymer electrode. *Indian Journal of Chemical Technology*, **15(4)**:319-324.
- Toyka, K. V., Drachman, D. B., Pestronk, A. e Kao, I. 1975. Myasthenia gravis; passive transfer from man to mouse. *Science*, **190(4212)**:397-399.
- Trubetskova, I. e Lampert, W. 2002. The juvenile growth rate of *Daphnia*: a short-term alternative to measuring the per capita rate of increase in ecotoxicology. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **42(2)**:193-198.
- Vanni, M. J. 1986. Fish predation and zooplankton demography: indirect effects. *Ecology*, **67(2)**:337-354.
- Veselá, S., Ondruška, V., Kuča, K. e Patočka, P. 2006. Freshwater microcrustacean *Daphnia magna* Straus as an early screen model to compare toxicity of acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Applied biomedicine*, **4(2)**:105-110.
- Villarroel, M. J., Ferrando, M. D., Sancho, E. e Andreu, E. *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **44(1)**:40-46.
- Villarroel, M. J., Sancho, E., Andreu-Moliner, E. e Ferrando, M. D. 2009. Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to

- individual growth and reproduction. *Science of the Total Environment*, **407(21)**:5537-5542.
- Walker C. H. 2001. Organic Pollutants: An Ecotoxicological Perspective. Taylor e Francis, New York, NY, USA.
- Walker, M. B. 1934. Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet*, **1**:1200-1201.
- Walker, M. B. 1937. Myasthenia gravis: A case in which fatigue of the forearm muscles could induce paralysis of the extraocular muscles. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **22**:7-55.
- Weigel, S. 2003. Occurrence, distribution and fate of pharmaceuticals and further polar contaminants in the marine environment. Tese de Doutorado, Departamento de Química. Universidade de Hamburgo. Hamburgo, Alemanha.
- Wenger, B., Quigley, M. D. e Kolka, M. A. 1993. Seven-day pyridostigmine administration and thermoregulation during rest and exercise in dry heat. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, **64(10)**:905-911.
- Wilks, S. 1977. On cerebritis, hysteria, and bulbar paralysis, an illustrative of arrest of function of the cerebrospinal centers. *Guy's Hospital Report*, **22**:7-55.
- Young, G. D., Evans, S. 1998. Safety and efficacy of DEET and permethrin in the prevention of arthropod attack. *Military Medicine*, **163(5)**:324-330.
- Yu, J. T., Bouwer, E. J. e Coelhan, M. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, **86(1-2)**:72-80.
- Zaffagnini, F. 1987. Reproduction in *Daphnia*. Em: Peters, R. H. e de Bernardi, R. *Daphnia*, volume 45. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, *Pallanza*, 245-284.
- Zar, J. H. 1996. Biostatistical Analysis. 3ª Edição. Prentice-Hall, Inc., USA.
- Zobov, V. V., Berezinskii, L. A., Aslyamova, A. A. e Reznik, V. S. 2005. Delayed Effects of *Daphnia* intoxication with selective and nonselective inhibitors of acetylcholinesterase. *Pharmacology and Toxicology*, **139(1)**:68-69.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
6. Anexos

## 6. Anexos

Anexo 1: Constituição do meio MBL (Stein, 1973) utilizado na cultura de *P. subcapitata* utilizada na alimentação das culturas e ensaios com *D. magna*.

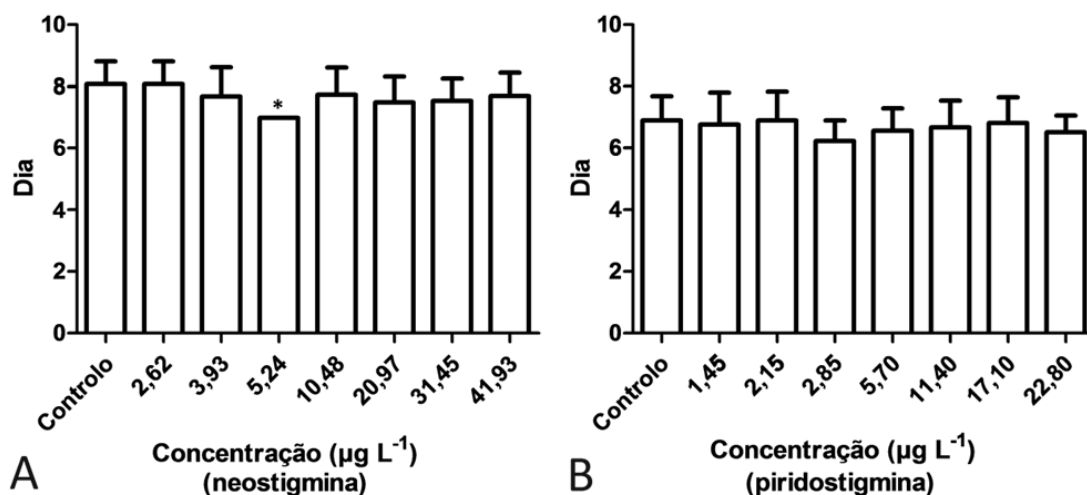
MBL	
Nutrientes	[ ] em solução (g L <sup>-1</sup> )
Macronutrientes	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,76
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	36,97
NaHCO <sub>3</sub>	12,6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71
NaNO <sub>3</sub>	85,01
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	28,42
Micronutrientes	
Na <sub>2</sub> .EDTA	4,36
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006
Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	250
Vitaminas (µg L <sup>-1</sup> )	
Tiamina	100
Biotina	0,5
Cianocobalamina	0,5

Anexo 2: Constituição do meio ASTM (ASTM, 1980; EPA, 1989) utilizado nas culturas e ensaios com *D. magna*.

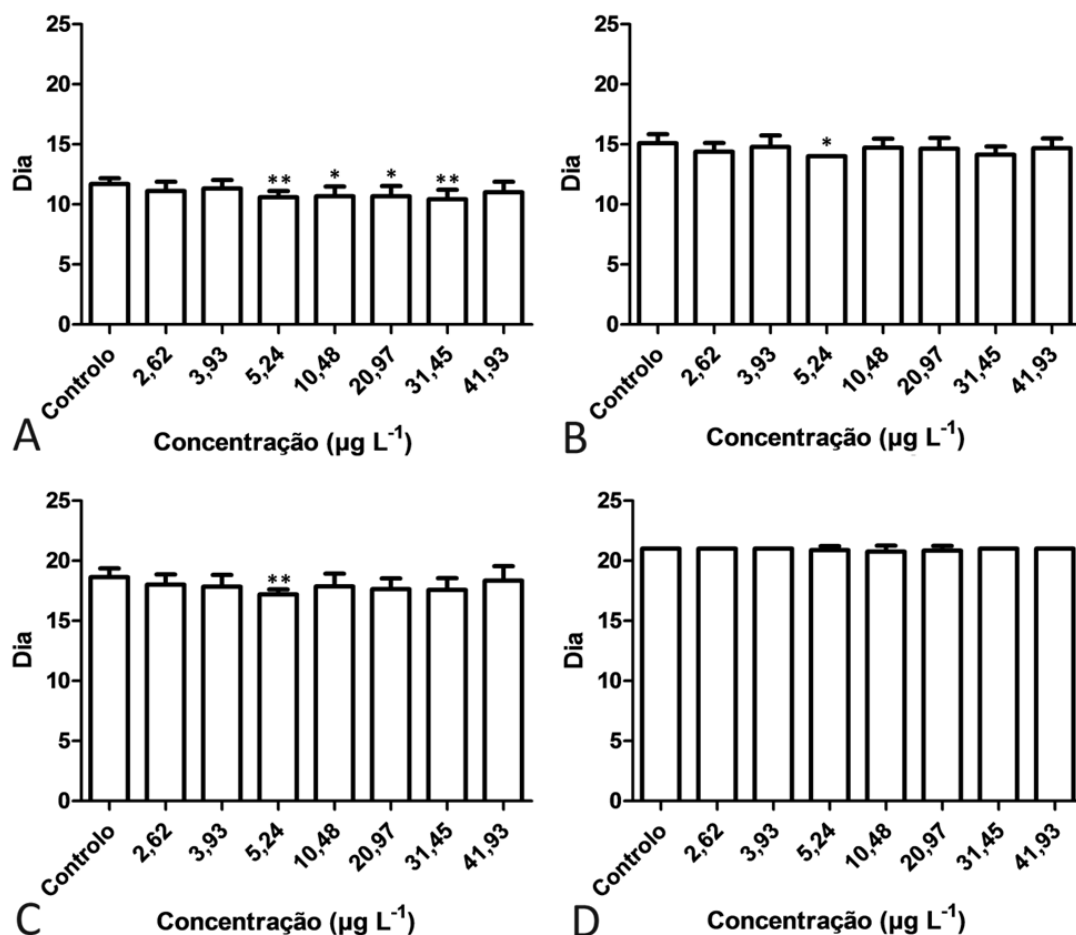
ASTM	
Nutrientes	[ ] em solução (mg L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	192
MgSO <sub>4</sub>	120
KCl	8
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	120
Vitaminas	[ ] em solução (µg L <sup>-1</sup> )
Tiamina	75
Biotina	1
Cianocobalamina	0,75



Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
6. Anexos

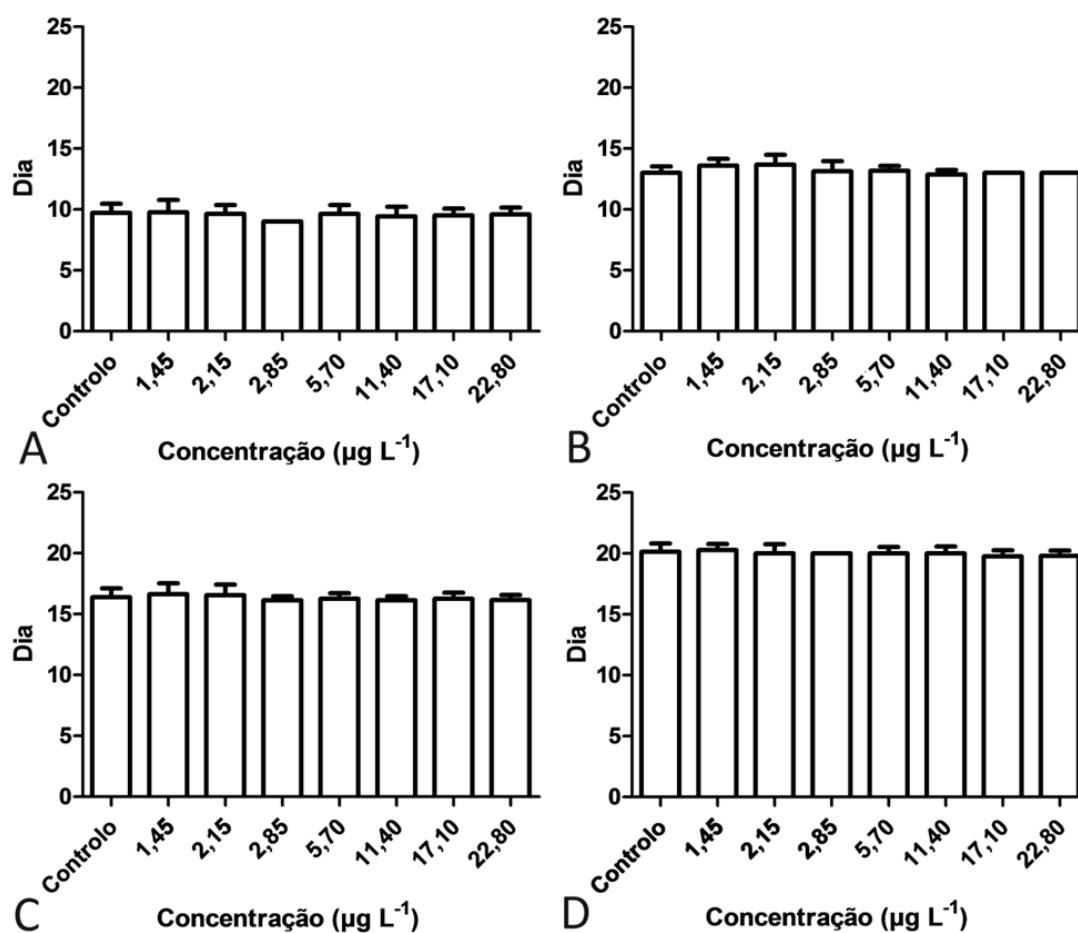


Anexo 3: Idade à maturação de *D. magna* sob exposição crónica a diferentes concentrações sub-letais de: A) neostigmina; B) piridostigmina; as barras correspondem à  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.



Anexo 4: Idade de *D. magna* sob exposição a diferentes concentrações de neostigmina na obtenção das diferentes ninhadas: A) 1; B) 2; C) 3; D) 4; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.

Toxicidade de drogas anticolinesterásicas terapêuticas em *Daphnia magna*  
6. Anexos



Anexo 5: Idade de *D. magna* sob exposição a diferentes concentrações de piridostigmina na obtenção das diferentes ninhadas: A) 1; B) 2; C) 3; D) 4; as barras correspondem a  $n = 10$ , as barras indicam o valor do desvio padrão e os asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) relativamente ao controlo.